

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCIELY GROSE COLODI

**ULVANAS MODIFICADAS VIA AMIDAÇÃO E AMINAÇÃO REDUTIVA:
SEMISSÍNTESE DE HÍBRIDOS ULVANA-KAPPA-CARRABIOSE E
ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

CURITIBA

2017

FRANCIELY GROSE COLODI

**ULVANAS MODIFICADAS VIA AMIDAÇÃO E AMINAÇÃO REDUTIVA:
SEMISSÍNTESE DE HÍBRIDOS ULVANA-KAPPA-CARRABIOSE E
ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciências-Bioquímica, no Curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Eugênia Duarte Nosedá
Coorientadores: Prof. Dr. Diogo Ricardo Bazan Ducatti
Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Colodi, Franciely Grose

Ulvanas modificadas via amidação e aminação redutiva: semissíntese de híbridos ulvana-*kappa*-carrabiose e atividades biológicas. / Franciely Grose Colodi. – Curitiba, 2017.

216 p.: il. ; 30cm.

Orientador: Maria Eugênia Duarte Nosedá

Coorientadores: Diogo Ricardo Bazan Ducatti

Miguel Daniel Nosedá

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Polissacarídeos 2. Alga verde 3. Ulva I. Título II. Nosedá, Maria Eugênia Duarte III. Ducatti, Diogo Ricardo Bazan IV. Nosedá, Miguel Daniel V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

CDD (20. ed.) 574.192482



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA)
Código CAPES: 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Tese de Doutorado de **FRANCIELY GROSE COLODI**, intitulada: **"ULVANAS MODIFICADAS VIA AMIDAÇÃO E AMINAÇÃO REDUTIVA: SEMISSÍNTESE DE HÍBRIDOS ULVANA-KAPPA-CARRABIOSE E ATIVIDADES BIOLÓGICAS"**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 31 de Julho de 2017.

MARIA EUGÊNIA DUARTE NOSEDA
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

ALEXANDRE ORSATO
Avaliador Externo (UEL)

JOANA LÉA MEIRA SILVEIRA
Avaliador Interno (UFPR)

SANDRA MARA WORANOVICZ BARREIRA
Avaliador Externo (UFPR)

SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHÖFER
Avaliador Interno (UFPR)

Ao meu pai, minha mãe e meu irmão,
meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

Deus, obrigada, obrigada e obrigada!

À professora Maria Eugênia Duarte Nosedá e aos professores Diogo R. Bazan Ducatti e Miguel D. Nosedá pela orientação e por tantos anos de convivência, ensinamentos, conversas, experiências e paciência. Obrigada, de coração!

À professora Sheila M. Brochado Winnischofer pela colaboração, atenção e paciência, meu muito obrigada.

Aos professores Alan G. Gonçalves e Joana L. M. Silveira pela correção da tese na banca interna e por terem aceito o convite para avaliar o projeto e os relatórios anuais. Muito obrigada pelas valiosas contribuições ao longo destes anos.

Aos servidores que auxiliam nas análises técnicas, muito obrigada.

Aos servidores, professores e alunos que empregam tempo e dedicação para o bem dos pós-graduandos e do curso de pós-graduação, muito obrigada.

Aos colegas e amigos de laboratório pela agradável convivência, momentos de descontração, auxílio no dia-a-dia, muito obrigada. Vocês moram no meu coração.

Aos colegas e amigos dos laboratórios “emprestados”, muito obrigada pela paciência, companheirismo, momentos de descontração 2 e carinho. Obrigada, mesmo! Vocês moram no meu coração 2.

Aos colegas e amigos dos laboratórios “vizinhos” pela convivência mais que agradável, momentos de descontração 3, conselhos e empréstimos super casuais (rs), muito obrigada. Vocês moram no meu coração 3.

Aos amigos de todos os momentos, obrigada por acreditarem em mim. Vocês são alívio para os momentos difíceis e alegria sem fim, a qual levo no coração.

À minha família extraordinária, obrigada pai, mãe e mano por estarem sempre comigo, mesmo quando longe. Amo muito vocês!

À UFPR, à FINEP, à CAPES e ao CNPq pela manutenção do Centro de RMN.

Ao curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica e aos órgãos financiadores das pesquisas na UFPR, Pronex Carboidratos, Fundação Araucária (CAPES - Bolsa de Doutorado).

*“When all are one and one is all
To be a rock and not to roll”*

(Jimmy Page e Robert Plant, 1971)

RESUMO

Ulvanas são polissacarídeos sulfatados produzidos por algas verdes do gênero *Ulva*. Este trabalho teve por objetivo a obtenção de polissacarídeos modificados derivados da ulvana da alga *U. fasciata*. A ulvana foi caracterizada por métodos químicos e espectroscópicos, pelas díades 1,4-ligadas: A_{3S}, β-D-GlcpA-(1→4)-α-L-Rhap 3-sulfato (39,3%); U_{3S}, β-D-Xylp-(1→4)-α-L-Rhap 3-sulfato (30,8%); B_{3S}, α-L-IdopA-(1→4)-α-L-Rhap 3-sulfato (17,5%) e U_{2',3S}, β-D-Xylp 2-sulfato-(1→4)-α-L-Rhap 3-sulfato (12,0%). A modificação da ulvana via amidação com EDC originou o intermediário O-acilisoureira e o subproduto N-acilureia, os quais foram caracterizados por RMN de ¹H e HSQC. A ulvana foi modificada por reações de amidação com EDC e NHS em presença de *n*-pentilamina e das diaminas 1,3-diaminopropano (DAP) e 1,6-diaminoexano (HMD), originando, respectivamente, as ulvanas-amida inéditas Fd5m, Fd3 e Fd6, caracterizadas por RMN pelas correlações de C1/H1 de α-L-ramnose 3-sulfato ligada à ácido β-D-glucurônico modificado por amidação. As ulvanas-amida Fd3 e Fd6, derivatizadas com diaminas, foram utilizadas na semissíntese dos polissacarídeos híbridos via aminação redutiva utilizando *kappa*-carrabiose (Kb). A semissíntese dos híbridos Fd3-Kb e Fd6-Kb foi comprovada por RMN por meio das correlações de C1/H1,1' das unidades de 3,6-anidrogactose da Kb reduzida, ligada covalentemente à ulvana. A ulvana também foi modificada por meio de reações sequenciais de oxidação-aminação redutiva com as diaminas DAP e HMD, originando, respectivamente, as ulvanas-amina inéditas Fn3 e Fn6. Estas ulvanas-amina foram submetidas à uma segunda etapa de aminação redutiva com Kb, originando os híbridos-amina Fn3-Kb e Fn6-Kb, também caracterizados por métodos químicos e espectroscópicos. As ulvanas-amina Fn3, Fn6 e híbridos-amina Fn3-Kb e Fn6-Kb mostraram-se citotóxicas tanto para células de fibroblasto normal humano MRC-5 quanto para células de melanoma metastático humano WM9. As ulvanas nativa, modificadas via amidação Fd5m, Fd3, Fd6 e híbridos-amida Fd3-Kb e Fd6-Kb mostraram baixa capacidade de alterar o metabolismo de fibroblasto normal humano MRC-5, ao passo que reduziram em média 30% da atividade metabólica das células de melanoma metastático humano WM9. Sugere-se que os derivados ulvana-amida apresentaram citotoxicidade seletiva para as células de linhagem tumoral WM9, o que traz perspectivas interessantes para o uso destas moléculas em terapias antitumoral. Os polissacarídeos inéditos derivados da ulvana de *U. fasciata* não exibiram atividade anticoagulante por ensaio de aPTT, assim como a ulvana nativa, o que traz perspectivas para utilização destas moléculas na composição de biomateriais.

Palavras-chave: Alga verde. Polissacarídeos. Modificação química.

ABSTRACT

Ulvans are sulfated polysaccharides biosynthesized by green seaweeds of *Ulva* genus. This work aimed to obtain chemically modified polysaccharides of the ulvan isolated from *U. fasciata*. The ulvan was characterized by chemical and spectroscopic methods, by 1,4-linked dyads: A_{3S}, β-D-GlcpA-(1→4)-α-L-Rhap 3-sulfate (39,3%), U_{3S}, β-D-Xylp-(1→4)-α-L-Rhap 3-sulfate (30,8%), B_{3S}, α-L-IdopA-(1→4)-α-L-Rhap 3-sulfate (17,5%) e U_{2',3S}, β-D-Xylp 2-sulfate-(1→4)-α-L-Rhap 3-sulfate (12,0%). Ulvan modification via amidation with EDC gave *O*-acylisourea intermediate and *N*-acylurea byproduct, which were characterized by ¹H NMR and HSQC. Ulvan was modified by amidation reactions with EDC and NHS in the presence of *n*-pentylamine and diamines 1,3-diaminopropane (DAP) and 1,6-diaminohexane (HMD), respectively, giving the novel fractions Fd5m, Fd3 and Fd6, characterized by C1/H1 correlations of α-L-rhamnose 3-sulfate bound to β-D-glucuronic acid modified by amidation. Ulvans-amide Fd3 and Fd6, derivatized with diamines, were used in semi-synthesis of the hybrid polysaccharides via reductive amination using *kappa*-carrabiose (Kb). The semi-synthesis of Fd3-Kb and Fd6-Kb hybrid polysaccharides was confirmed by the correlations attributed to C1/H1,1' units of the reduced 3,6-anhydrogalactose units of Kb, covalently attached to ulvan. Ulvan was also modified by sequential oxidation-reductive amination reactions with DAP and HMD diamines, yielding the novel Fn3 and Fn6 fractions. Fn3 and Fn6 were submitted to a second reductive amination step with Kb, given hybrids Fn3-Kb and Fn6-Kb, which were characterized by chemical and spectroscopic methods. Fn3, Fn6, Fn3-Kb and Fn6-Kb were cytotoxic for both MRC-5 human normal fibroblast cells and WM9 human metastatic melanoma cells. Ulvans Fd5m, Fd3, Fd6, Fd3-Kb and Fd6-Kb presented low ability to modify MRC-5 human normal fibroblast metabolism, although these fractions reduced approximately 30% of the metabolic activity of WM9 human metastatic melanoma cells. Therefore, it was suggested that ulvan-amide derivatives exhibited selective cytotoxicity for the WM9 tumor cells, which brings interesting perspectives for the use of these molecules in antitumor therapies. These novel polysaccharides, obtained from *U. fasciata*, did not exhibit anticoagulant activity by aPTT assay, as well as native ulvan, which provides perspectives for the use of these molecules in the composition of biomaterials.

Key-words: Green seaweed. Polysaccharides. Chemical modification

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DAS GALACTANAS	22
FIGURA 2 - ESTRUTURAS DAS PRINCIPAIS DÍADES PRESENTES NAS ULVANAS	31
FIGURA 3 - PRINCÍPIO GERAL DA OXIDAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS COM PERIODATO (IO_4^-) ILUSTRADO POR UNIDADES DE β -D-Glcp.....	37
FIGURA 4 - MECANISMO DE AMINAÇÃO REDUTIVA COM AMINAS PRIMÁRIAS	38
FIGURA 5 - MECANISMO DE AMIDAÇÃO DE CARBOXILA VIA CARBODIIMIDA .	40
FIGURA 6 - OLIGOSSACARÍDEOS REDUTORES OBTIDOS POR HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DE <i>KAPPA</i> -CARRAGENANA COMERCIAL	42
FIGURA 7 - REAÇÃO DE CICLOADIÇÃO COM A FUNÇÃO AZIDA.....	43
FIGURA 8 - ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DOS DERIVADOS MODIFICADOS DA ULVANA DE <i>U. fasciata</i>	51
FIGURA 9 - ESQUEMA DE OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES MODIFICADAS	56
FIGURA 10 - FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DE <i>Kappaphycus alvarezii</i>	74
FIGURA 11 - ESPECTROS DE RMN DE ^1H DAS FRAÇÕES K, K-01P E K-01S	76
FIGURA 12 - ESPECTRO DE HSQC E ASSINALAMENTOS DA <i>KAPPA</i> -CARRAGENANA DE <i>K. alvarezii</i>	77
FIGURA 13 - ESPECTROS DE RMN DE ^1H DA K-CARRAGENANA SULFATADA KS E DA <i>KAPPA</i> -CARRAGENANA NATIVA K.....	80
FIGURA 14 - ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO QUIMICAMENTE SULFATADA KS	82
FIGURA 15 - INTEGRAÇÕES DA REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO QUIMICAMENTE SULFATADA KS	83
FIGURA 16 - ESQUEMA DAS PRINCIPAIS DÍADES SULFATADAS DA FRAÇÃO KS	85
FIGURA 17 - OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES REDUTORAS Kb, K15 E KS15 A PARTIR DAS <i>KAPPA</i> -CARRAGENANAS K E KS	86
FIGURA 18 - ESPECTROS DE RMN DE ^1H DAS <i>KAPPA</i> -CARRAGENANAS HIDROLISADAS Kb E K15 E DA <i>KAPPA</i> -CARRAGENANA NATIVA K	89

FIGURA 19 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA <i>KAPPA</i> -CARRABIOSE (FORMA ALDEÍDO E ALDEÍDO HIDRATADO) E <i>KAPPA</i> -CARRABIITOL (FORMA ALDITOL).....	90
FIGURA 20 - ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO Kb OBTIDA DE <i>K. alvarezii</i>	90
FIGURA 21 - ESPECTROS DE RMN DE ¹ H DA <i>KAPPA</i> -CARRAGENANA SULFATADA E HIDROLISADA KS15 E DA <i>KAPPA</i> -CARRAGENANA SULFATADA KS.....	93
FIGURA 22 - CROMATOGRAMAS DE HPSEC-MALLS-RI DAS <i>KAPPA</i> -CARRAGENANAS K, K15, KS E KS15	96
FIGURA 23 - FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DA ALGA VERDE <i>Ulva fasciata</i>	98
FIGURA 24 - ESPECTROS DE RMN DE ¹³ C DAS FRAÇÕES F E F3 OBTIDAS DE <i>U. fasciata</i>	101
FIGURA 25 - CROMATOGRAMAS DE HPSEC-MALLS-RI DAS FRAÇÕES F E F3 OBTIDAS DE <i>U. fasciata</i>	102
FIGURA 26 - ESQUEMA DA DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA FINA DA ULVANA F OBTIDA DA ALGA VERDE <i>Ulva fasciata</i>	103
FIGURA 27 - INTEGRAÇÕES DA REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DA FRAÇÃO DESSULFATADA FRD OBTIDA DE <i>U. fasciata</i>	112
FIGURA 28 - ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO F OBTIDA DA ALGA <i>U. fasciata</i>	114
FIGURA 29 - ESTRUTURA QUÍMICA DA ULVANA OBTIDA DA ALGA VERDE <i>U. fasciata</i>	118
FIGURA 30 - ESQUEMA DO MECANISMO DE AMIDAÇÃO DA ULVANA VIA CARBODIIMIDA UTILIZANDO <i>N</i> -HIDROXISUCCINIMIDA (NHS)	120
FIGURA 31 - INTERMEDIÁRIO O-ACILISOUREIA E SUBPRODUTO <i>N</i> -ACILUREIA	122
FIGURA 32 - ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DO PRODUTO DA REAÇÃO DE AMIDAÇÃO COM EDC: INTERMEDIÁRIO O-ACILISOUREIA E SUBPRODUTO <i>N</i> -ACILUREIA.....	123
FIGURA 33 - ESPECTRO DE HSQC MOSTRANDO O INTERMEDIÁRIO DA REAÇÃO DE AMIDAÇÃO COM EDC: O-ACILISOUREIA.....	123
FIGURA 34 - ESPECTRO DE HSQC DO PRODUTO DA REAÇÃO COM <i>n</i> -PENTILAMINA EM PRESENÇA DE EDC E NHS	125
FIGURA 35 - ESPECTRO DE HSQC DO PRODUTO DA REAÇÃO UTILIZANDO 1,3-DIAMINOPROPANO EM PRESENÇA DE EDC E NHS	127

FIGURA 36 - CROMATOGRAMAS DE HPSEC-MALLS-RI DA ULVANA NATIVA F ISOLADA DE <i>U. fasciata</i> E DAS ULVANAS-AMIDA Fd3, Fd6 e Fd5m.....	132
FIGURA 37 - ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DA FRAÇÃO Fd5m	133
FIGURA 38 - ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO Fd5m.....	134
FIGURA 39 - ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO Fd3.....	136
FIGURA 40 - ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DA FRAÇÃO Fd6	137
FIGURA 41 - ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO Fd6.....	138
FIGURA 42 - INTEGRAÇÕES DOS ESPECTROS DE RMN DE ¹ H DAS FRAÇÕES Fd5m, Fd3 E Fd6	139
FIGURA 43 - INSERTO DA REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO Fd3	140
FIGURA 44 - ESQUEMA GERAL DA AMIDAÇÃO DA ULVANA E POSTERIOR LIGAÇÃO A <i>KAPPA</i> -CARRABIOSE (Kb).....	142
FIGURA 45 - INSERTOS DOS ESPECTROS DE HSQC DAS FRAÇÕES R E E OBTIDAS DA DIÁLISE DO PRODUTO DA REAÇÃO DE AMINAÇÃO REDUTIVA COM AS FRAÇÕES ULVANA-AMIDA Fd3 E <i>KAPPA</i> -CARRABIOSE Kb.....	143
FIGURA 46 - CROMATOGRAMAS DE HPSEC-MALLS-RI DA ULVANA NATIVA F ISOLADA DE <i>U. fasciata</i> E DAS ULVANAS-AMIDA Fd3, Fd6, Fd3-Kb e Fd6-Kb ..	150
FIGURA 47 - ESPECTRO DE HSQC-EDITADO DA FRAÇÃO Fd3-Kb	151
FIGURA 48 - INTEGRAÇÕES DOS ESPECTROS DE RMN DE ¹ H DAS FRAÇÕES Fd3-Kb E Fd6-Kb	153
FIGURA 49 - ESPECTROS DE HSQC E HSQC-EDITADO DA FRAÇÃO Fd6-Kb ..	155
FIGURA 50 - CLIVAGEM OXIDATIVA POR PERIODATO	158
FIGURA 51 - ESPECTRO DE HSQC DO PRODUTO DA REAÇÃO SEQUENCIAL DE OXIDAÇÃO-AMINAÇÃO REDUTIVA	160
FIGURA 52 - ESPECTROS DE RMN DE ¹ H DOS PRODUTOS DAS REAÇÕES DE OXIDAÇÃO-AMINAÇÃO REDUTIVA DA ULVANA F UTILIZANDO 1,3-DIAMINOPROPANO (DAP)	162
FIGURA 53 - CROMATOGRAMAS DE HPSEC-MALLS-RI DA ULVANA NATIVA F ISOLADA DE <i>U. fasciata</i> E DAS ULVANAS-AMINA Fn3 e Fn6 E HPSEC-RI DAS FRAÇÕES F, Fn3 E Fn6	165
FIGURA 54 - ESPECTRO DE HSQC DA ULVANA-AMINA Fn3.....	168
FIGURA 55 - ESPECTRO DE HSQC DA ULVANA-AMINA Fn6.....	170

FIGURA 56 - CROMATOGRAMAS DE HPSEC-MALLS-RI DAS ULVANAS-AMINA HÍBRIDAS Fn3-Kb E Fn6-Kb E HPSEC-RI DAS FRAÇÕES F, Fn3, Fn3-Kb, Fn6 E Fn6-Kb	174
FIGURA 57 - ESPECTRO DE HSQC-EDITADO DA FRAÇÃO Fn3-Kb.....	175
FIGURA 58 - ESPECTRO DE HSQC-EDITADO DA FRAÇÃO Fn6-Kb.....	177
FIGURA 59 - LINHAGEM DE FIBROBLASTO NORMAL HUMANO MRC-5	179
FIGURA 60 - LINHAGEM DE MELANOMA METASTÁTICO HUMANO WM9	179
FIGURA 61 - ATIVIDADE METABÓLICA DA LINHAGEM DE FIBROBLASTO NORMAL HUMANO MRC-5 APÓS 72 h DE TRATAMENTO COM ULVANA F, ULVANAS-AMIDA Fd5m, Fd3 E Fd6 E HÍBRIDOS-AMIDA Fd3-Kb E Fd6-Kb NAS CONCENTRAÇÕES DE 25, 100 E 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	181
FIGURA 62 - ATIVIDADE METABÓLICA DA LINHAGEM DE FIBROBLASTO NORMAL HUMANO MRC-5 APÓS 72 h DE TRATAMENTO COM ULVANA F, ULVANAS-AMINA Fn3 E Fn6 E HÍBRIDOS-AMINA Fn3-Kb E Fn6-Kb NAS CONCENTRAÇÕES DE 25, 100 E 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	181
FIGURA 63 - ATIVIDADE METABÓLICA DA LINHAGEM DE MELANOMA METASTÁTICO HUMANO WM9 APÓS 72 h DE TRATAMENTO COM ULVANA F, ULVANAS-AMIDA Fd5m, Fd3 E Fd6 E HÍBRIDOS-AMIDA Fd3-Kb E Fd6-Kb NAS CONCENTRAÇÕES DE 25, 100 E 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	185
FIGURA 64 - ATIVIDADE METABÓLICA DA LINHAGEM DE MELANOMA METASTÁTICO HUMANO WM9 APÓS 72 h DE TRATAMENTO COM ULVANA F, ULVANAS-AMINA Fn3 E Fn6 E HÍBRIDOS-AMINA Fn3-Kb E Fn6-Kb NAS CONCENTRAÇÕES DE 25, 100 E 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	185

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DAS CARRAGENANAS DE ACORDO COM ESTRUTURAS IDEALIZADAS PARA AS DÍADES DE UNIDADES A E B.....	24
TABELA 2 - TEMPOS DE RETENÇÃO, MASSAS MOLARES PONDERAIS MÉDIAS (M_w) E EQUAÇÕES OBTIDAS POR REGRESSÃO LINEAR.....	66
TABELA 3 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES OBTIDAS DE <i>K. alvarezii</i>	74
TABELA 4 - RECUPERAÇÃO E ANÁLISES QUÍMICAS DA FRAÇÃO KS OBTIDA DE <i>K. alvarezii</i>	79
TABELA 5 - ASSINALAMENTOS DAS DÍADES PRESENTES NA FRAÇÃO KS OBTIDA DE <i>K. alvarezii</i>	84
TABELA 6 - RECUPERAÇÃO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES Kb, K15 e KS15 OBTIDAS DE <i>K. alvarezii</i>	87
TABELA 7 – ASSINALAMENTOS DE ^{13}C E ^1H DAS FRAÇÕES Kb, KbRZ E K15 OBTIDAS DE <i>K. alvarezii</i>	91
TABELA 8 - VALORES DE MASSA MOLAR PONDERAL MÉDIA (M_w) RELATIVA E ESTIMADA POR HPSEC-MALLS-RI, MASSA MOLAR NUMÉRICA MÉDIA (M_n) ESTIMADA POR HPSEC-MALLS-RI E DISPERSÃO (Đ) DAS FRAÇÕES K, K15, KS e KS15 OBTIDAS DE <i>K. alvarezii</i>	95
TABELA 9 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS F E F3 OBTIDAS DE <i>U. fasciata</i>	99
TABELA 10 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES F E F3 OBTIDAS DE <i>U. fasciata</i>	100
TABELA 11 - RECUPERAÇÃO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES F, FD, FR, FRD E FR* OBTIDAS DE <i>U. fasciata</i>	105
TABELA 12 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES F, FD, FR, FRD E FR* OBTIDAS DE <i>U. fasciata</i>	106
TABELA 13 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DA ULVANA OBTIDA DE <i>U. fasciata</i> : FRAÇÕES CARBOXIRREDUZIDA COM NaBD_4 (FR*) E CARBOXIRREDUZIDA COM NaBH_4 E DESSULFATADA (FRD).....	109
TABELA 14 - PROPORÇÕES DAS DÍADES PRESENTES NA ULVANA DE <i>U. fasciata</i>	111
TABELA 15 - ASSINALAMENTOS DAS DÍADES CONSTITUINTES DA ULVANA F OBTIDA DE <i>U. fasciata</i> DE ACORDO COM AS ANÁLISES DE RMN DE ^1H , ^{13}C , HSQC e COSY.....	116

TABELA 16 - OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS PARA MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA ULVANA VIA AMIDAÇÃO	121
TABELA 17 - ASSINALAMENTOS DO 1,3-DIAMINOPROPANO OBTIDOS POR ESPECTROSCOPIA DE RMN (¹ H E HSQC) EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE pH	126
TABELA 18 - RECUPERAÇÃO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES NATIVA F E Fd5m, Fd3 e Fd6 OBTIDAS APÓS AMIDAÇÃO DA ULVANA DE <i>U. fasciata</i>	130
TABELA 19 - VALORES DE MASSA MOLAR PONDERAL MÉDIA (M _w) RELATIVA E ESTIMADA POR HPSEC-MALLS-RI, MASSA MOLAR NUMÉRICA MÉDIA (M _n) ESTIMADA POR HPSEC-MALLS-RI E DISPERSÃO (Đ) DAS FRAÇÕES F, Fd3, Fd6 e Fd5m.....	131
TABELA 20 - OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS DE AMINAÇÃO REDUTIVA COM AS FRAÇÕES ULVANA-AMIDA (Fd3) E KAPPA-CARRABIOSE (Kb)	145
TABELA 21 - RECUPERAÇÃO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES HÍBRIDAS Fd3-Kb e Fd6-Kb OBTIDAS DAS ULVANAS AMIDA DE <i>U. fasciata</i> E DA KAPPA-CARRABIOSE DE <i>K. alvarezii</i>	147
TABELA 22 - VALORES DE MASSA MOLAR PONDERAL MÉDIA (M _w) RELATIVA E ESTIMADA POR HPSEC-MALLS-RI, MASSA MOLAR NUMÉRICA MÉDIA (M _n) ESTIMADA POR HPSEC-MALLS-RI E DISPERSÃO (Đ) DAS FRAÇÕES Fd3, Fd6, Fd3-Kb e Fd6-Kb	149
TABELA 23 - CONDIÇÕES DAS REAÇÕES DE OXIDAÇÃO-AMINAÇÃO REDUTIVA DA ULVANA F OBTIDA DE <i>U. fasciata</i> COM 1,3-DIAMINOPROPANO (DAP)	159
TABELA 24 - RECUPERAÇÃO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES Fn3 E Fn6 OBTIDAS POR OXIDAÇÃO-AMINAÇÃO REDUTIVA DA ULVANA DE <i>U. fasciata</i>	163
TABELA 25 - RECUPERAÇÃO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES Fn3, Fn6, Fn3-Kb e Fn6-Kb	172
TABELA 26 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE UTILIZANDO O ENSAIO TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA (aPTT)	189
TABELA 27 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FRAÇÃO NECESSÁRIA PARA TRIPLICAR O TEMPO DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA DA SALINA	189
TABELA 28 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE UTILIZANDO O ENSAIO TEMPO DE TROMBINA (TT)	193
TABELA 29 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE UTILIZANDO O ENSAIO TEMPO DE PROTROMBINA (PT)	193

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

I	Integral
-CH ₂ -	Metileno / metilênico
-CH ₃	Metil / metílico
D	Dispersão, refere-se à variação entre o número de moléculas de um sistema e suas massas molares
A _{3S}	Ulvanobiurônico 3-sulfato tipo A: →4)-β-D-GlcpA-(1→4)-α-L-Rhap 3-sulfato-(1
AcOH	Ácido acético
Am	<i>n</i> -Petilamina
ANOVA	Análise de variância
aPTT	Tempo de tromboplastina parcialmente ativada
B _{3S}	Ulvanobiurônico 3-sulfato tipo B: →4)-α-L-IdopA-(1→4)-α-L-Rhap 3-sulfato-(1
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
DAP	1,3-Diaminopropano
DMEM	Sigla em inglês para o meio de cultivo <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMFa	Dimetilformamida anidra
DMSO	Dimetilsulfóxido
DS	Grau de substituição
EDC	<i>N</i> -(3-Dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida
F	Ulvana obtida de <i>U. fasciata</i>
FD	Ulvana dessulfatada
Fd3	Ulvana-amida obtida da amidação com a diamina DAP
Fd3-Kb	Híbrido de ulvana-amida Fd3 e <i>kappa</i> -carrabiose
Fd5m	Ulvana-amida obtida da amidação com a monoamina Am
Fd6	Ulvana-amida obtida da amidação com a diamina HMD
Fd6-Kb	Híbrido de ulvana-amida Fd6 e <i>kappa</i> -carrabiose
Fn3	Ulvana-amina obtida da aminação com a diamina DAP
Fn3-Kb	Híbrido de ulvana-amina Fn3 e <i>kappa</i> -carrabiose
Fn6	Ulvana-amina obtida da aminação com a diamina HMD
Fn6-Kb	Híbrido de ulvana-amina Fn6 e <i>kappa</i> -carrabiose
FR	Ulvana carboxirreduzida com NaBH ₄
FR*	Ulvana carboxirreduzida com NaBD ₄ (marcada com deutério)
FRD	Ulvana carboxirreduzida com NaBH ₄ e dessulfatada
HBSS	Sigla em inglês para solução de sais <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>

HMD	1,6-Diaminoexano
HPSEC	Sigla em inglês para cromatografia de exclusão estérica de alta pressão
ICH ₃	Iodometano
IR	Sigla em inglês para índice de refração diferencial
K	<i>kappa</i> -Carragenana obtida de <i>K. alvarezii</i>
K15	Despolimerizado da <i>kappa</i> -Carragenana de <i>K. alvarezii</i>
Kb	<i>kappa</i> -Carrabiose obtida de <i>K. alvarezii</i>
KbRZ	<i>kappa</i> -Carrabitol obtido da redução de Kb com NaBH ₃ CN
KS	<i>kappa</i> -Carragenana quimicamente sulfatada a partir da <i>kappa</i> -carragenana de <i>K. alvarezii</i>
KS15	Despolimerizado da <i>kappa</i> -carragenana quimicamente sulfatada
MALLS	Sigla em inglês para espalhamento de luz em multiângulos
meq.	Miliequivalentes
MES	Ácido 2-(<i>N</i> -morfolino)-etanosulfônico
M _n	Massa molar numérica média
M _w	Massa molar ponderal média
MRC-5	Linhagem celular de fibroblasto normal humano
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
MWCO	Sigla em inglês para <i>Molecular weight cut-off</i> e refere-se ao limite de exclusão pela membrana de diálise
NHS	<i>N</i> -Hidroxisuccinimida
Pir.-SO ₃	Complexo piridina-trióxido de enxofre
ppm	Partes por milhão
PT	Tempo de protrombina
RMN	Ressonância magnética nuclear
TFA	Ácido trifluoracético
TNR	Terminal não redutor
TRIS	Tris-(hidroximetil)-aminometano
TT	Tempo de trombina
U _{2',3S}	Ulvanobiose 2',3-dissulfato: →4)-β-D-Xylp 2-sulfato-(1→4)-α-L-Rhap 3-sulfato-(1
U _{3S}	Ulvanobiose 3-sulfato: →4)-β-D-Xylp-(1→4)-α-L-Rhap 3-sulfato-(1
WM9	Linhagem celular de melanoma metastático humano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE MACROALGAS MARINHAS	20
2.1.1	Polissacarídeos isolados de algas vermelhas	21
2.1.1.1	Galactanas sulfatadas	22
2.1.1.2	Galactanas sulfatadas do tipo carragenana	23
2.1.1.3	Aspectos do uso industrial das carragenanas	25
2.1.1.4	Aspectos biológicos das carragenanas	25
2.1.2	Polissacarídeos isolados de algas verdes	26
2.1.2.1	Polissacarídeos do tipo ulvana	28
2.1.2.2	Aspectos químicos e biológicos no estudo das ulvanas	28
2.1.2.3	Estrutura química das ulvanas	30
2.1.2.4	Propriedades biológicas das ulvanas	33
2.2	MODIFICAÇÕES QUÍMICAS EM POLISSACARÍDEOS	34
2.2.1	Modificações químicas em hidroxilas	35
2.2.1.1	Modificações químicas em hidroxilas secundárias com <i>m</i> -periodato	36
2.2.2	Modificações químicas com grupos amino: aminação reductiva	37
2.2.3	Modificações químicas em ácidos carboxílicos: amidação	39
2.2.4	Modificações químicas por meio de hidrólise: produção de oligossacarídeos a partir de galactanas de algas vermelhas	41
2.2.5	Modificações químicas via <i>click chemistry</i>	43
2.2.6	Modificações químicas que originam redes integradas de polissacarídeos	44
2.3	TENDÊNCIAS NA ÁREA DE MODIFICAÇÕES QUÍMICAS EM POLISSACARÍDEOS	45
3	JUSTIFICATIVA	49
4	OBJETIVOS	50
4.1	OBJETIVO GERAL	50
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
5	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	51
6	MATERIAL E MÉTODOS.....	52
6.1	MATERIAL.....	52
6.2	EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS: OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DE ULVANA (F) E K-CARRAGENANA (K)	52
6.3	TRATAMENTO COM CLORETO DE POTÁSSIO	53

6.4	HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL	53
6.5	CARBOXIRREDUÇÃO	54
6.6	DESSULFATAÇÃO POR TRATAMENTO SOLVOLÍTICO.....	54
6.6.1	Preparo do sal de piridônio	54
6.6.2	Solvólise.....	54
6.7	ANÁLISE DE METILAÇÃO	55
6.7.1	Preparo do sal de trietilamônio.....	55
6.7.2	Metilação e derivatização.....	55
6.8	MODIFICAÇÕES QUÍMICAS.....	56
6.9	MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA ULVANA VIA AMIDAÇÃO COM MONOAMINA: OBTENÇÃO DA FRAÇÃO Fd5m.....	57
6.10	MODIFICAÇÃO DA ULVANA VIA AMIDAÇÃO COM DIAMINAS: OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES Fd3 E Fd6	57
6.11	MODIFICAÇÃO DA ULVANA VIA OXIDAÇÃO SEGUIDA DE AMINAÇÃO REDUTIVA: OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES Fn3 E Fn6	58
6.12	SULFATAÇÃO QUÍMICA DA K-CARRAGENANA: OBTENÇÃO DA FRAÇÃO QUIMICAMENTE SULFATADA KS	59
6.13	HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DAS K-CARRAGENANAS NATIVA (K) E QUIMICAMENTE SULFATADA (KS): OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES Kb, K15 E KS15	60
6.14	SEMISSÍNTESE DE POLISSACARÍDEOS HÍBRIDOS SULFATADOS VIA AMINAÇÃO REDUTIVA.....	60
6.14.1	Semissíntese de polissacarídeos híbridos a partir de ulvanas-amida: obtenção dos polissacarídeos híbridos sulfatados Fd3-Kb e Fd6-Kb.....	60
6.14.2	Semissíntese de polissacarídeos híbridos a partir de ulvanas-amina: obtenção dos polissacarídeos híbridos sulfatados Fn3-Kb e Fn6-Kb.....	61
6.15	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	62
6.15.1	Dosagem de carboidratos totais.....	62
6.15.2	Dosagem de proteínas totais	62
6.15.3	Dosagem de ácidos urônicos	62
6.15.4	Dosagem de grupos O-sulfato	63
6.15.5	Determinação da rotação óptica específica	63
6.15.6	Determinação dos teores de nitrogênio	64
6.16	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	64
6.16.1	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM)	64
6.16.2	Cromatografia de exclusão por tamanho de alta performance (HPSEC) acoplada a detector de espalhamento de luz laser em multiângulos (MALLS) e índice de refração (RI) diferencial	65

6.17	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	66
6.17.1	Ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN de ^{13}C)	67
6.17.2	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H)	67
6.17.3	COSY (COSY ^1H – ^1H)	67
6.17.4	HSQC (HSQC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$)	67
6.17.5	HSQC-editado	68
6.17.6	HMBC	68
6.18	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA DE CÉLULAS DE LINHAGENS NORMAL E TUMORAL NA PRESENÇA DAS MOLÉCULAS MODIFICADAS	68
6.18.1	Cultivo de células: linhagens, manutenção e preservação das culturas	69
6.18.2	Preparo das frações polissacarídicas para os ensaios biológicos	70
6.18.3	Determinação da atividade metabólica <i>in vitro</i> das células de fibroblasto normal humano MRC-5 e melanoma metastático humano WM9	70
6.19	ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTICOAGULANTE <i>IN VITRO</i>	71
6.19.1	Tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT)	71
6.19.2	Tempo de protrombina (PT)	71
6.19.3	Tempo de trombina (TT)	72
6.19.4	Tratamento e análise dos dados	72
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
7.1	OBTENÇÃO E ANÁLISE DOS POLISSACARÍDEOS DA ALGA VERMELHA <i>Kappaphycus alvarezii</i>	73
7.1.1	Extração e obtenção dos polissacarídeos de <i>K. alvarezii</i>	73
7.1.2	Análises químicas das frações polissacarídicas	74
7.1.3	Tratamento com cloreto de potássio e espectroscopia de RMN da fração K	75
7.2	SULFATAÇÃO DA K-CARRAGENANA	78
7.2.1	Análises químicas da <i>kappa</i> -carragenana quimicamente sulfatada	78
7.2.2	Espectroscopia de RMN da <i>kappa</i> -carragenana quimicamente sulfatada ...	80
7.3	PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS REDUTORAS A PARTIR DE K E KS	85
7.3.1	Análises químicas das frações Kb, K15 e KS15	87
7.3.2	Espectroscopia de RMN das frações Kb, K15 e KS15	88
7.3.3	Análise de HPSEC-MALLS-RI das frações de <i>kappa</i> -carragenana	94
7.4	OBTENÇÃO E ANÁLISE QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS DA ALGA VERDE <i>Ulva fasciata</i>	98
7.4.1	Extração e obtenção dos polissacarídeos	98
7.4.2	Análises químicas das frações F e F3	99
7.4.3	Composição monossacarídica das frações F e F3	99

7.4.4	Espectroscopia de RMN das frações F e F3.....	100
7.4.5	Análise de HPSEC-MALLS-RI das frações F e F3.....	101
7.4.6	Determinação da estrutura química fina da ulvana obtida de <i>U. fasciata</i> ..	103
7.4.6.1	Carboxirredução e dessulfatação da ulvana F de <i>U. fasciata</i>	104
7.4.6.2	Análise de metilação da ulvana F de <i>U. fasciata</i>	107
7.4.7	Espectroscopia de RMN da ulvana F de <i>U. fasciata</i>	113
7.5	PROCESSO DE OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO DE AMIDAÇÃO DA ULVANA OBTIDA DE <i>U. fasciata</i>	119
7.5.1	Otimização da reação de amidação.....	120
7.6	CARACTERIZAÇÃO DAS ULVANAS-AMIDA Fd5m, Fd3 E Fd6.....	129
7.6.1	Análises químicas das frações Fd5m, Fd3 e Fd6	130
7.6.2	Análise de HPSEC-MALLS-RI das frações Fd5m, Fd3 e Fd6	130
7.6.3	Espectroscopia de RMN das frações Fd5m, Fd3 e Fd6.....	132
7.7	SEMISSÍNTESE DE POLISSACARÍDEOS HÍBRIDOS A PARTIR DAS ULVANAS-AMIDA Fd3 E Fd6.....	141
7.7.1	Otimização da reação de aminação-redutiva	142
7.8	CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS HÍBRIDOS Fd3-Kb E Fd6-Kb	147
7.8.1	Análises químicas das frações Fd3-Kb e Fd6-Kb	147
7.8.2	Análise de HPSEC-MALLS-RI das frações Fd3-Kb e Fd6-Kb	148
7.8.3	Espectroscopia de RMN das frações Fd3-Kb e Fd6-Kb.....	149
7.9	PROCESSO DE REAÇÃO SEQUENCIAL DE OXIDAÇÃO-AMINAÇÃO REDUTIVA DA ULVANA DE <i>Ulva fasciata</i>	157
7.9.1	Ajuste das condições reacionais de oxidação-aminação redutiva	159
7.10	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES ULVANAS-AMINA Fn3 E Fn6	163
7.10.1	Análises químicas das frações Fn3 e Fn6	163
7.10.2	Análise de HPSEC-MALLS-RI das frações Fn3 e Fn6.....	165
7.10.3	Espectroscopia de RMN das frações Fn3 e Fn6.....	166
7.11	SEMISSÍNTESE DE POLISSACARÍDEOS HÍBRIDOS A PARTIR DAS ULVANAS-AMINA Fn3 E Fn6.....	172
7.12	CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES HÍBRIDAS Fn3-Kb E Fn6-Kb.....	172
7.12.1	Análises químicas das frações híbridas Fn3-Kb e Fn6-Kb.....	172
7.12.2	Análise de HPSEC-MALLS-RI das frações híbridas Fn3-Kb e Fn6-Kb.....	173
7.12.3	Espectroscopia de RMN das frações Fn3-Kb e Fn6-Kb.....	174
7.13	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA <i>IN VITRO</i> DE FIBROBLASTO NORMAL HUMANO (MRC-5) E MELANOMA METASTÁTICO HUMANO (WM9) NA PRESENÇA DAS ULVANAS MODIFICADAS	179

7.13.1	Citotoxicidade frente à linhagem de fibroblasto normal humano MRC-5	180
7.13.2	Citotoxicidade frente à linhagem de melanoma metastático humano WM9	184
7.14	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE	188
7.14.1	Teste de tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT)	188
7.14.2	Testes de tempo de trombina (TT) e tempo de protrombina (PT)	192
8	CONCLUSÕES	194
9	PERSPECTIVAS	196
	REFERÊNCIAS	197

1 INTRODUÇÃO

O mercado global de polímeros encontra-se em ascensão e estima-se que até 2021 cresça mais de 8,1 bilhões de dólares, apenas no segmento de revestimento inteligente de superfícies (n-tech Research, 2016).

Polissacarídeos apresentam elevado potencial no mercado de polímeros e têm sido utilizados em áreas anteriormente exclusivas de polímeros de petróleo. Estes biopolímeros são utilizados em diversos setores industriais como, agrônômico, têxtil, alimentício, farmacêutico e cosmético (Campo *et al.*, 2009). O aumento na demanda industrial por polissacarídeos é explicado por sua biodegradabilidade e pela facilidade de obtenção em grandes quantidades a partir de fontes renováveis (Šimkovic, 2008).

Adicionalmente, polissacarídeos de origem marinha são destaque em estudos nas áreas de nanobiotecnologia para liberação controlada e alvo-específica de fármacos, curativos para lesões de pele, matrizes para engenharia de tecidos, terapias antitumoral, biosensores e tratamento de águas (Manivasagan e Oh, 2016).

Estes biopolímeros de grande interesse biotecnológico são prontamente obtidos de algas marinhas, as quais constituem excelente fonte de moléculas com estruturas químicas particulares e representam fontes renováveis para obtenção de biomateriais (Lahaye e Robic, 2007; Morelli *et al.*, 2016).

Neste contexto, estratégias para modificações estruturais de polissacarídeos são efetivas na obtenção de moléculas inovadoras, que buscam suprir novas demandas biotecnológicas e industriais. As modificações químicas visam a adição de grupos hidrofóbicos, ácidos, básicos ou outras funcionalidades, que alteram as propriedades físico-químicas dos polissacarídeos (Cumpstey, 2013).

Assim, o presente trabalho propõe modificações químicas de polissacarídeos do tipo ulvana, isolados da alga verde *Ulva fasciata*, utilizando duas estratégias: (1) reações de amidação envolvendo um grupo amina e a carboxila de unidades de ácido urônico do polímero e (2) oxidação dos monossacarídeos com hidroxilas vicinais seguida de aminação redutiva. A utilização de diaminas nas reações de amidação e aminação redutiva permite inserir grupos amino livres à ulvana, possibilitando a semissíntese de polissacarídeos híbridos naturalmente sulfatados por meio da adição de *kappa*-carrabiose, um dissacarídeo redutor obtido de *kappa*-carragenana. Os produtos das modificações químicas obtidos no presente trabalho constituem moléculas inovadoras que apresentam potenciais aplicações biotecnológicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE MACROALGAS MARINHAS

Algas marinhas são importantes fontes de diversos compostos de estruturas singulares e de amplo interesse industrial (Michalak e Chojnacka, 2015). Dentre estes compostos, destacam-se os polissacarídeos, que podem corresponder a até 76% do peso seco das algas (Kraan, 2012).

Os polissacarídeos da parede celular das algas são biossintetizados tanto em condições normais quanto em condições de estresse fisiológico (Singh *et al.*, 2017). Eles consistem em celulose e hemiceluloses e ainda polissacarídeos solúveis, geralmente sulfatados, sintetizados na matriz extracelular. Celulose e hemiceluloses oferecem sustentação no ambiente aquático, enquanto a matriz extracelular promove regulação mecânica, osmótica ou iônica, garantindo a adaptação das algas ao ambiente marinho (Kraan, 2012; Kloareg e Quatrano, 1988).

A versatilidade das macroalgas marinhas como fonte renovável de biomateriais incentiva esforços para a produção de biomassa em biorefinarias de algas, projetadas para a produção, em larga escala, de polissacarídeos e outros compostos de interesse (Masarin *et al.*, 2016). Neste contexto, o potencial biotecnológico dos polissacarídeos pode ser explorado de forma sistemática para expandir a produção das biomoléculas.

Os polissacarídeos isolados da matriz extracelular das algas marinhas apresentam características particulares em função da composição monossacarídica e diversidade estrutural. Além da presença de monossacarídeos raros, suas estruturas químicas apresentam variações nos tipos e posições das ligações glicosídicas, distribuição e grau de ramificações, massa molar e grupos O-substituintes, como éster de sulfato, éter de metil, acetal de ácido pirúvico, glicosilações, entre outros (De Ruiter e Rudolph, 1997; Lahaye e Robic, 2007; Zibetti *et al.*, 2009).

Dentre os polissacarídeos produzidos por algas marinhas, destacam-se as ulvanas e galactanas sulfatadas produzidas, respectivamente, por algas verdes e vermelhas (Mayakrishnan *et al.*, 2013). Estes biopolímeros são capazes de estimular a saúde humana, podendo ser utilizados como fonte de alimentos funcionais e prebióticos (Lovegrove *et al.*, 2017; Raposo *et al.*, 2016; Wells *et al.*, 2017).

As diversas funções desempenhadas por polissacarídeos e/ou carboidratos em sistemas biológicos correlacionam-se com a complexidade estrutural destas moléculas. A importância dos carboidratos presentes em proteoglicanas, glicoproteínas e glicolipídeos é comprovada em vários eventos biológicos como, infecções virais e bacterianas, crescimento tumoral, metástase e processos inflamatórios (Groth *et al.*, 2009; Meissen *et al.*, 2009; Bishop *et al.*, 2007).

Os polissacarídeos sulfatados atuam nos sistemas biológicos por meio de interações com proteínas celulares, formando complexos estericamente orientados. A regulação de processos biológicos por polissacarídeos sulfatados não resulta apenas da densidade eletrônica de cargas e interações eletrostáticas, pois requer o conjunto de atributos estruturais que resultam no sinal necessário para o desenvolvimento da sinalização celular, reconhecimento e interações moleculares (Pomin, 2009).

A exemplo das interações moleculares, experimentos *in vivo* demonstraram que os polissacarídeos sulfatados isolados da alga vermelha *Gracilaria intermedia* estimularam a atividade de Na⁺/K⁺-ATPases de enterócitos de roedores, inibindo o acúmulo de fluido intestinal, e reduziram a mobilidade gastrointestinal provavelmente por mecanismo anticolinérgico (Leódido *et al.*, 2017).

Há inúmeros artigos e revisões que relatam diversas atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados (Wijesekara *et al.*, 2011; Patel, 2012; Raposo *et al.*, 2015). As propriedades antivirais representam a maior parte dos estudos biológicos dos polissacarídeos isolados de algas vermelhas, seguidos pelas avaliações das atividades anticoagulante, antitumoral e imunomoduladora (Duarte *et al.*, 2001; Talarico *et al.*, 2004, 2005, 2007, 2011; Araújo *et al.*, 2013; Mendes *et al.*, 2014; Ropellato *et al.*, 2015;). Os polissacarídeos isolados de algas verdes são investigados principalmente por suas atividades antitumorais, seguidas pelas atividades anticoagulante, antioxidante e moduladora do sistema imune (Raposo *et al.*, 2015).

2.1.1 Polissacarídeos isolados de algas vermelhas

As algas vermelhas estão distribuídas principalmente no ambiente marinho, encontram-se amplamente distribuídas ao longo da costa brasileira e alcançam maior diversidade em regiões tropicais (Raven *et al.*, 2001). Este grupo de algas compõe um grupo taxonômico polifilético de origem evolutiva bastante antiga, a divisão Rhodophyta, totaliza 7.131 espécies e pertence ao reino Plantae (AlgaeBase, 2017).

Os polissacarídeos isolados de algas vermelhas são componentes de reserva ou ainda componentes estruturais da parede celular.

Os carboidratos de reserva são biossintetizados por algas vermelhas nas formas de glicosídeos de baixa massa molar (floridosídeos) e de “glicogênio das florídeas”, produtos de reserva com massas molares altas, constituídos por unidades de α -D-glucopiranosose 1,4-ligadas ramificadas em C6 (Usov, 2011).

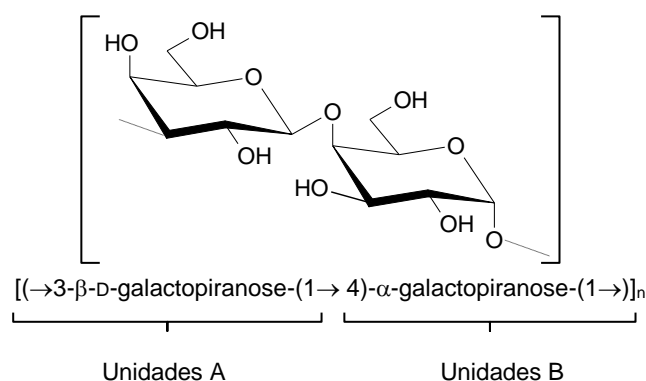
A parede celular da maioria das algas vermelhas inclui um componente interno rígido composto por microfibrilas de polissacarídeos e uma camada externa mucilaginosa, composta geralmente por galactanas sulfatadas, polímeros sulfatados de galactose (Raven *et al.*, 2001; Painter, 1983).

2.1.1.1 Galactanas sulfatadas

O estudo da estrutura química dos polissacarídeos isolados de algas vermelhas se iniciou em meados do século XX com estudos estruturais da agarose. Em 1937 a agarose foi isolada e sua análise estrutural foi finalizada apenas em 1956, tendo sido identificadas as unidades monossacarídicas muito singulares de 3,6-anidrogactose (Usov, 2011).

A estrutura das galactanas consiste em cadeias lineares de unidades de β -D-galactopiranosose ligadas glicosídicamente através da posição 3 (unidade A) e α -galactopiranosose ligadas glicosídicamente através da posição 4 (unidade B), formando um arranjo alternado de unidades A e B, as quais são denominadas díades (FIGURA 1) (Percival e McDowell, 1967).

FIGURA 1 - ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DAS GALACTANAS



FONTE: O autor (2017).

As unidades A podem apresentar substituições por grupos éster de sulfato e/ou éter de metil em C2, C4 ou C6, além de acetal de ácido pirúvico e algumas vezes outros monossacarídeos, como D-xilose, 4-O-metil-L-galactose ou ácido-D-glucurônico, formando O-glicosilações. As unidades B podem estar ciclizadas em 3,6-anidrogallactose ou substituídas em C2, C3 e C6 por grupos éster de sulfato e/ou éter de metil (Usov, 1998, 2011).

A formação das unidades ciclizadas de 3,6-anidrogallactose *in vivo* decorre da ação de enzimas específicas que promovem uma reação de substituição (S_N2) interna entre o grupo sulfato (grupo abandonador) em C6 e a hidroxila (nucleófilo) em C3 nas unidades 4-ligadas de α -galactose 6-sulfato. O mesmo resultado pode ser alcançado *in vitro* por meio do tratamento alcalino dos polissacarídeos que apresentam unidades de α -galactose 6-sulfato precursoras (Usov, 2011; Ciancia *et al.*, 1993).

Estes biopolímeros são classificados em carragenanas, agaranas ou galactanas DL-híbridas, de acordo com a enantiomericidade das unidades B, as quais pertencem às séries D-, L- ou D e L, respectivamente (Estevez *et al.*, 2001, 2004; Zibetti *et al.*, 2009).

2.1.1.2 Galactanas sulfatadas do tipo carragenana

As carragenanas podem ser classificadas em diferentes famílias de acordo com a posição das substituições por grupos éster de sulfato nas unidades A e B, além da ciclização das unidades B (TABELA 1) (Knutsen *et al.*, 1994).

As carragenanas da família *kappa* apresentam polímeros com unidades de β -D-galactopiranosose (unidades A) substituídas por sulfato em C4. As unidades B podem estar ou não ciclizadas em forma de 3,6-anidrogallactose, podendo apresentar-se substituídas por grupos sulfato em C2 e C6. Dentre os subtipos de carragenanas, esta família inclui as carragenanas do tipo *kappa*, *iota*, *mu*, *nu* e *omicron*.

As carragenanas do tipo *kappa* apresentam díades repetitivas de G4S-DA e G4S-D, nomenclaturas relativas aos dissacarídeos $\rightarrow 3)$ - β -D-galactopiranosose 4-sulfato-(1 \rightarrow 4)- α -3,6-anidro-galactopiranosose-(1 e $\rightarrow 3)$ - β -D-galactopiranosose 4-sulfato-(1 \rightarrow 4)- α -galactopiranosose-(1, respectivamente.

A família *lambda* é composta por carragenanas que possuem as unidades A substituídas por grupos sulfato em C2 e as unidades B, as quais podem estar parcialmente na forma ciclizada constituindo as unidades de 3,6-anidrogallactose 2-

sulfato ou na forma 2- e/ou 2,6-dissulfatada. Ácido pirúvico na forma de acetal 4,6-O-(1-carboxietilideno) também pode ser um dos substituintes que constituem as galactanas desta família, a qual inclui as carragenanas do tipo *lambda*, *xi*, *theta* e *pi*.

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DAS CARRAGENANAS DE ACORDO COM ESTRUTURAS IDEALIZADAS PARA AS DÍADES DE UNIDADES A E B

Família e subtipos	Díade ¹	Unidade A	Unidade B
Kappa			
<i>Kappa</i> (κ)	G4S-DA	→3)-β-D-Galp 4-sulfato-(1	→4)-α-D-3,6-anidro-Galp-(1
<i>Iota</i> (ι)	G4S-DA2S	→3)-β-D-Galp 4-sulfato-(1	→4)-α-D-3,6-anidro-Galp 2-sulfato-(1
<i>Mu</i> (μ)	G4S-D6S	→3)-β-D-Galp 4-sulfato-(1	→4)-α-D-Galp 6-sulfato-(1
<i>Nu</i> (ν)	G4S-D2S,6S	→3)-β-D-Galp 4-sulfato-(1	→4)-α-D-Galp 2,6-dissulfato-(1
<i>Omicron</i> (\omicron)	G4S-D2S	→3)-β-D-Galp 4-sulfato-(1	→4)-α-D-Galp 2-sulfato-(1
Lambda			
<i>Lambda</i> (λ)	G2S-D2S,6S	→3)-β-D-Galp 2-sulfato-(1	→4)-α-D-Galp 2,6-dissulfato-(1
<i>Xi</i> (ξ)	G2S-D2S	→3)-β-D-Galp 2-sulfato-(1	→4)-α-D-Galp 2-sulfato-(1
<i>Theta</i> (θ)	G2S-DA2S	→3)-β-D-Galp 2-sulfato-(1	→4)-α-D-3,6-anidro-Galp 2-sulfato-(1
<i>Pi</i> (π)	GP2S-D2S	→3)-β-D-Galp 2-sulfato 4,6-O-(1'-carboxietilideno)-(1	→4)-α-D-Galp 2-sulfato-(1
Beta			
<i>Beta</i> (β)	G-DA	→3)-β-D-Galp-(1	→4)-α-D-3,6-anidro-Galp-(1
<i>Alfa</i> (α)	G-DA2S	→3)-β-D-Galp-(1	→4)-α-D-3,6-anidro-Galp 2-sulfato-(1
<i>Gamma</i> (γ)	G-D6S	→3)-β-D-Galp-(1	→4)-α-D-Galp 6-sulfato-(1
<i>Delta</i> (δ)	G-D2S,6S	→3)-β-D-Galp-(1	→4)-α-D-Galp 2,6-dissulfato-(1
Omega			
<i>Omega</i> (ω)	G6S-DA	→3)-β-D-Galp 6-sulfato-(1	→4)-α-D-3,6-anidro-Galp-(1
<i>Psi</i> (ψ)	G6S-D6S	→3)-β-D-Galp 6-sulfato-(1	→4)-α-D-Galp 6-sulfato-(1

¹ Nomenclatura proposta por Knutsen *et al.* (1994).

A família *omega* apresenta carragenanas 6-sulfatadas nas unidades A, sendo que as unidades B podem se apresentar como 3,6-anidrogactose ou substituídas em C6 por grupos sulfato. Inclui as carragenanas do tipo *omega* e *psi*.

A família *beta* não apresenta unidade A sulfatada, enquanto as unidades B são substituídas por sulfato em C2 e C6, ou ciclizadas na forma de 3,6-anidrogactose. Inclui as carragenanas do tipo *beta*, *alpha*, *gamma* e *delta* (Knutsen *et al.*, 1994).

2.1.1.3 Aspectos do uso industrial das carragenanas

A química de carboidratos de algas vermelhas contempla, em sua maioria, macrófitas marinhas de diferentes grupos, dos quais se destaca a ordem Gigartinales, que inclui as principais espécies cultivadas e comercializadas pelo mundo: *Eucheuma denticulatum* e *Kappaphycus alvarezii*, importantes produtoras de carragenanas (McHugh, 2003).

O mercado global para carragenanas foi avaliado em 762,35 milhões de dólares em 2016, de forma que as carragenanas apresentam uma participação de cerca de 13,3% do mercado mundial de alimentos, bebidas e hidrocolóides (Mordor Intelligence, 2017). As carragenanas de uso industrial compõem, principalmente, produtos lácteos, carnes processadas, formulações dietéticas, fórmulas para lactentes, cremes dentais, cosméticos, preparações para a pele, pesticidas e laxantes (Necas e Bartosikova, 2013).

As galactanas que geleificam são modelos muito populares para o estudo de conformações de polissacarídeos e interações moleculares que conduzem à formação de géis (Usov, 2011). A capacidade de carragenanas formarem géis e soluções viscosas está correlacionada com a conformação estrutural do polissacarídeo, contemplada pela razão molar entre as unidades de 3,6-anidrogactose e gactose, bem como a presença de grupos sulfato (Usov, 1998; Usov e Klochkova, 1992).

As propriedades espessantes, geleificantes e estabilizantes das carragenanas permitem sua ampla utilização industrial. Tais propriedades são aplicadas no controle da viscosidade e melhoramento da textura de alimentos. As carragenanas são capazes de estabilizar preparações para cremes dentais e absorver fluidos corporais quando utilizados na fabricação de curativos. Devido a sua boa compressibilidade, alta robustez e viscoelasticidade persistente, as carragenanas também são utilizadas como excipientes na fabricação de formas farmacêuticas para produção de comprimidos (Campo *et al.*, 2009).

2.1.1.4 Aspectos biológicos das carragenanas

A atividade biológica das carragenanas deve-se principalmente aos grupos éster de sulfato presentes em suas estruturas, os quais são fortemente aniônicos e capazes de interagir com cargas positivas de receptores ou outras estruturas celulares

proteicas. Assim, as carragenanas são capazes de interferir na modulação do sistema imune e apresentam atividades anticoagulante, antitrombótica, antiviral e antitumoral (Necas e Bartosikova, 2013; Zhou *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2006).

Oligossacarídeos de carragenana quimicamente sulfatada apresentaram melhores resultados para redução tumoral em relação aos oligossacarídeos nativos, acetilados ou fosforilados. Os derivados sulfatados, administrados diariamente ($200 \mu\text{g.g}^{-1}$) por 14 dias em camundongos portadores de Sarcoma 180, reduziram, em peso, 54% da massa tumoral e promoveram o aumento de 76% da atividade das células natural-killer (Yuan *et al.*, 2011). Carragenanas de baixa massa molar nativas e quimicamente sulfatadas foram testadas *in vivo* em modelo de Sarcoma 180 em camundongos. A carragenana comercial nativa de M_w igual a 1.726 g.mol^{-1} , administrada oralmente na dose de 100 mg.kg^{-1} , mostrou maior inibição da formação do tumor que as frações sulfatadas em maior ou menor grau. Adicionalmente, as carragenanas apresentaram efeitos nos macrófagos, aumentando a taxa de fagocitose e estimulando o sistema imune (Haijin *et al.*, 2003).

Estudos das propriedades imunomodulatórias de diferentes carragenanas mostram que estas atuam de maneira dose-dependente na secreção de interleucina anti-inflamatória IL-10 pelas células do sistema imune de camundongos. As análises estruturais sugerem que os grupos sulfato adicionais da carragenana da família *lambda* aumentam a concentração de cálcio no citoplasma dos macrófagos e provavelmente têm papéis importantes no processo de ativação de espécies reativas de oxigênio. Os autores sugerem que a modulação do sistema imune por carragenanas é dependente da composição monossacarídica dos polissacarídeos, bem como do número, posição e distribuição dos grupos sulfato ao longo das cadeias de galactanas (Yermak *et al.*, 2012).

2.1.2 Polissacarídeos isolados de algas verdes

As algas verdes (Chlorophyta) representam mais de 6.000 espécies do reino Plantae, as quais mostram grande diversidade estrutural e no ciclo de vida. A maioria destas algas é aquática de água doce, mas a classe Ulvophyceae tem representantes predominantemente marinhos, dentre os quais se destacam espécies do gênero *Ulva*, produtoras de ulvanas, polissacarídeos sulfatados (AlgaeBase, 2017; Raven *et al.*, 2001; Alves *et al.*, 2013a; Paulert *et al.*, 2009; Cassolato, 2008).

As espécies de *Ulva* sp. constituem organismos oportunistas. Sendo comuns em regiões costeiras de todo o mundo, estão frequentemente envolvidas nos eventos de floração de algas verdes causadas pela eutrofização de ambientes costeiros. A proliferação destas algas gera grande quantidade de biomassa, a qual, geralmente, não é utilizada. Neste contexto, as ulvanas obtidas da parede celular das espécies de *Ulva* sp. têm sido foco de diversas investigações, devido ao potencial biotecnológico que polissacarídeos sulfatados e complexos representam na busca por novos polímeros funcionais (Robic *et al.*, 2008; Alves *et al.*, 2013a; Kikionis *et al.*, 2015).

Dentre os polímeros biossintetizados pelas algas da ordem Ulvales, os polissacarídeos da parede celular representam entre 38 a 54% do peso seco das algas. Destacam-se quatro grupos de polissacarídeos produzidos por algas do gênero *Ulva*, sendo os dois principais, as ulvanas solúveis e a celulose insolúvel, e dois outros caracterizados por xiloglucanas lineares solúveis em meio alcalino e glucuronanas, polímeros de ácido glucurônico (Lahaye e Robic, 2007).

A distribuição e associação destes polissacarídeos nas paredes celulares das algas do gênero *Ulva* seguem um padrão de interconexões realizadas por ligações de hidrogênio entre as moléculas de celulose e β -D-xiloglucanas 1,4-ligadas, integrando a porção rígida da estrutura da parede celular. Enquanto que a porção amorfa é composta por moléculas de proteínas e β -D-glucuronanas 1,4-ligadas, que interagem com as ulvanas por meio de interações iônicas. Além disso, fora do ambiente celular, as ulvanas são capazes de interagir entre si por meio de interações iônicas com ácido bórico e cátions divalentes (Lahaye *et al.*, 1998 *apud* Lahaye e Robic, 2007).

Os polissacarídeos, constituintes da parede celular, biossintetizados pelas algas do gênero *Ulva* são os mais estudados dentre os polissacarídeos de algas verdes. Polissacarídeos produzidos por algas da divisão Chlorophyta apresentam grande diversidade estrutural como: as ulvanas isoladas de algas do gênero *Ulva* (Lahaye e Robic, 2007), heteroramnanas sulfatadas obtidas de espécies do gênero *Gayralia* (Cassolato *et al.*, 2008; Ropelatto *et al.*, 2015), galactanas sulfatadas ou ainda arabinogalactanas sulfatadas sintetizadas por algas do gênero *Codium* (Farias *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2014). Estes polissacarídeos não seguem um padrão estrutural repetitivo de unidades monossacarídicas como o observado para as galactanas sulfatadas produzidas pelas algas vermelhas. Com exceção das ulvanas, estudos estruturais dos polissacarídeos biossintetizados por algas verdes são reduzidos quando comparados aos estudos com polissacarídeos de algas vermelhas.

2.1.2.1 Polissacarídeos do tipo ulvana

O termo ulvana foi utilizado primeiramente por Lahaye e Axelos em 1993 para designar as moléculas de xiloramnoglucuronanas sulfatadas obtidas de espécies de *Ulva* spp. e caracterizadas por suas propriedades geleificantes. Atualmente, o termo ulvana refere-se aos polissacarídeos biossintetizados por algas da ordem Ulvales, principalmente dos gêneros *Ulva* e *Enteromorpha*, isolados geralmente por extrações aquosas a quente (Lahaye e Robic, 2007).

Ulvanas são heteropolissacarídeos sulfatados complexos, solúveis em água e compostos por unidades monossacarídicas neutras de α -L-ramnose e β -D-xilose, e ácidos urônicos, D-glucopiranurônico e L-idopiranurônico. Os monossacarídeos apresentam-se unidos por ligações glicosídicas nas posições 1 e 4, sendo que as proporções entre as unidades monossacarídicas constituintes podem variar (Lahaye *et al.*, 1997; Lahaye e Robic, 2007; Robic *et al.*, 2009).

2.1.2.2 Aspectos químicos e biológicos no estudo das ulvanas

Nas ulvanas, as unidades de ramnose e ácido D-glucurônico ocorrem geralmente na forma de díades repetitivas, constituídas por dissacarídeos de $\rightarrow 4$)- β -D-glucopiranurônico-(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnose-(1, denominadas de ácido aldobiurônico ou ainda ácido ulvanobiurônico (Percival e McDowell, 1967; Lahaye e Robic, 2007).

Adicionalmente, alguns outros polissacarídeos contendo monossacarídeos neutros estão presentes nos extratos polissacarídicos de diferentes espécies da ordem Ulvales, como glucose, galactose, manose e arabinose, além de alguns derivados naturalmente metilados, como 3-O-metil-L-ramnose e 3/4-O-metil-hexose (Lahaye e Robic, 2007; Ray e Lahaye, 1995a). No entanto ressalta-se que manose e galactose não são parte constituinte das ulvanas porque constituem uma fração distinta de polissacarídeos neutros (Bryhni, 1978).

As algas verdes e plantas vasculares acumulam polissacarídeos de reserva na forma de amido, ou α -poliglucanas compostas por amilose e amilopectina. A amilose é composta por uma cadeia linear de glucana α -(1 \rightarrow 4) ligada com algumas poucas ramificações α -(1 \rightarrow 6). A amilopectina possui uma estrutura muito mais ramificada, definida por ramificações α -(1 \rightarrow 6) da cadeia de glucana linear a cada 9 a

10 nm de comprimento, ou seja, para aproximadamente 10 unidades de glucose lineares existe uma ramificação (Shimonaga *et al.*, 2007).

Os polissacarídeos de reserva das algas vermelhas são armazenados no citosol, diferentemente, das α -poliglucanas de reserva das algas verdes, as quais são produzidas e armazenadas no interior dos plastídeos (Usov, 2011).

Portanto, a glucose presente nos extratos de algas verdes pode ser derivada da extração parcial dos polissacarídeos de reserva e pode variar conforme as condições de extração (Bryhni, 1978).

Diferentes métodos de obtenção de polissacarídeos e/ou diferentes condições ecofisiológicas são causas possíveis das variações da composição monossacarídica dos polissacarídeos extraídos de algas verdes (Lahaye e Robic, 2007). Neste contexto, a biossíntese dos polissacarídeos correlaciona-se com as condições ecofisiológicas em que se encontram os espécimes de algas. Acredita-se que processos enzimáticos de sulfatação, dessulfatação e epimerização devam ocorrer nos polissacarídeos em resposta a liberação de fatores de crescimento e/ou fatores ambientais, tendo em vista que a síntese de ácido idurônico, assim como a biossíntese dos glicosaminoglicanos nos animais, provavelmente, decorre da ação de uma enzima epimerase, que converte ácido glucurônico em idurônico, após a síntese e endereçamento do polímero através do complexo de Golgi (Lahaye e Robic, 2007).

Além das mudanças na condição ambiental, as proporções de ácido idurônico também podem variar em função da resistência que as ligações glicosídicas vizinhas às unidades monossacarídicas ácidas apresentam aos processos hidrolíticos. A substituição do C5 de unidades piranosídicas de glucose por grupos polares e com carga negativa, como carbonilas ou carboxilas, pode exercer efeitos estéricos e/ou indutivos nos átomos de oxigênio das ligações glicosídicas, tornando-as mais resistentes à hidrólise ácida (BeMiller, 1967). No entanto, unidades de ácido idurônico são parcialmente destruídas durante a hidrólise ácida com H_2SO_4 0,5 mol.L⁻¹, sendo consideradas tão lábeis quanto monossacarídeos neutros (Conrad, 1980).

Apesar das condições ecofisiológicas afetarem a biossíntese dos polissacarídeos, não há relato que correlacione diferenças nas condições fisiológicas das algas e alterações químicas na composição das ulvanas (Lahaye e Robic, 2007). Neste contexto, destaca-se que, recentemente, ulvanas também foram isoladas a partir de algas de água doce. As macroalgas verdes *Ulva flexuosa* (Ulvales) e *Cladophora glomerata* (Cladophorales) foram coletadas na Polônia em regiões de rio

e lago de água doce, respectivamente. Os polissacarídeos foram isolados por extração aquosa a 75-85 °C e caracterizados por análise elementar de carbono e enxofre, espectroscopia de infravermelho e RMN de ^1H . Os autores demonstram a presença de unidades de ramnose 3-sulfato ligadas a ácido glucurônico e ácido idurônico para ambos polissacarídeos investigados (Pankiewicz *et al.*, 2016).

A presença de ulvanas nas macroalgas verdes de água doce sugere que estes polissacarídeos sulfatados também são importantes na manutenção dos espécimes mesmo em ambientes não salinos. Este fato pode ser justificado pelo elevado caráter higroscópico das ulvanas, que evita a dessecação do ambiente extracelular e ainda facilita a flutuação das frondes (Paradossi *et al.*, 1999; Wood, 1974). Adicionalmente, as ulvanas formam uma rede de baixa porosidade e resistente a ação de enzimas, que envolve a porção rígida da parede celular, composta por α -celulose, protegendo-a da ação de bactérias (Bobin-Dubigeon *et al.* 1997).

2.1.2.3 Estrutura química das ulvanas

As informações estruturais disponíveis para os polissacarídeos denominados ulvanas remontam a história da determinação química destas biomoléculas. Desde os primeiros trabalhos, publicados na década de 60, sugeria-se que a estrutura das ulvanas seria composta, em grande parte, por cadeias de ramnose 1,4-ligadas e substituídas em C3, sendo que as posições das substituições por éster de sulfato foram determinadas por meio de análises químicas, espectroscopia de infravermelho e modificações estruturais nas moléculas de ulvana (Percival e McDowell, 1967; Lahaye e Robic, 2007).

A partir dos resultados de oxidações, ou da produção de oligossacarídeos e hidrólises ácidas brandas, foi determinado que os monossacarídeos ramnose, xilose e ácido glucurônico apresentam-se na mesma cadeia polissacarídica. Na década de 90, a presença de unidades de xilose 2-sulfato na estrutura das ulvanas foi confirmada por estudos de RMN além de análises de metilação, dessulfatação e carboxirredução (Ray e Lahaye, 1995b; Lahaye e Robic, 2007).

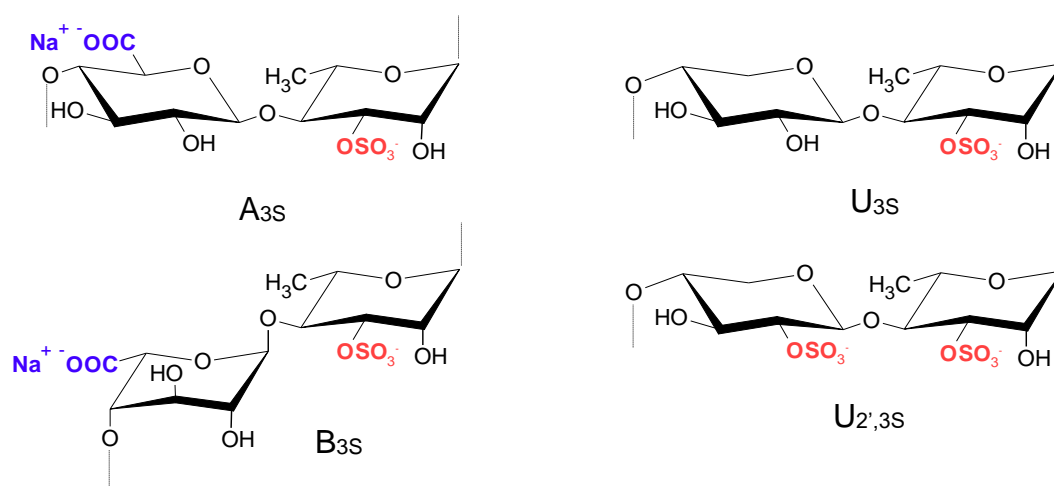
Estudos posteriores permitiram isolar ácidos aldobiurônicos, os quais continham tanto ácido glucurônico quanto ácido idurônico, e também identificaram unidades de ramnose substituídas em C2 por ácido glucurônico por meio da produção

de oligossacarídeos de ulvanas quimicamente dessulfatadas (Lahaye e Ray, 1996; Lahaye e Robic, 2007).

A partir dos estudos realizados pelo grupo de Lahaye foi possível identificar as díades recorrentes em ulvanas (FIGURA 2), as quais podem se apresentar em diferentes proporções e diferentes sequências nos polissacarídeos isolados de diferentes fontes.

Visando a caracterização fina das ulvanas, Lahaye e Ray (1996), utilizaram uma enzima ulvanolítica para produzir oligossacarídeos. A enzima extracelular com atividade ulvana-liase foi isolada de uma bactéria marinha gram-negativa, e permitiu clivar as ligações 1,4 entre unidades de ramnose 3-sulfato e ácido glucurônico, resultando em oligossacarídeos com uma extremidade não redutora de ácido glucurônico insaturado, o ácido 4-deoxi-L-treohex-4-enopiranosidurônico.

FIGURA 2 - ESTRUTURAS DAS PRINCIPAIS DÍADES PRESENTES NAS ULVANAS



A _{3S}	Ulvanobiurônico 3-sulfato tipo A	→4)-β-D-GlcpA-(1→4)-α-L-Rhap 3-sulfato-(1
B _{3S}	Ulvanobiurônico 3-sulfato tipo B	→4)-α-L-IdopA-(1→4)-α-L-Rhap 3-sulfato-(1
U _{3S}	Ulvanobiose 3-sulfato	→4)-β-D-Xylp-(1→4)-α-L-Rhap 3-sulfato-(1
U _{2',3S}	Ulvanobiose 2',3-dissulfato	→4)-β-D-Xylp 2-sulfato-(1→4)-α-L-Rhap 3-sulfato-(1

FONTE: Modificado de Lahaye (1998).

A partir do uso da enzima ulvana-liase puderam ser determinadas diferentes sequências oligossacarídicas. De acordo com o código de letras e números propostos por Lahaye (1998), representado na FIGURA 2, foram isolados oligossacarídeos repetitivos das díades de ulvanobiurônico 3-sulfato tipo A (A_{3S}), oligossacarídeos

contendo a díade de ulvanobiurônico 3-sulfato tipo B (B_{3S}) e oligossacarídeos contendo a díade de ulvanobiose 3-sulfato (U_{3S}), além de oligossacarídeos com a sequência repetitiva de ulvanobiurônico 3-sulfato tipo A (A_{3S}) intercalada por uma unidade de ácido glucurônico. A obtenção deste último oligossacarídeo demonstrou que uma unidade extra de $\rightarrow 4$)- β -D-glucopiranurônico-(1 pode quebrar a sequência regular de repetição do dissacarídeo ulvanobiurônico 3-sulfato tipo A, indicando um sítio de clivagem das ulvanas por enzimas do tipo glucuronana-liases (Lahaye, 1998).

Quando repetitivas, as díades A_{3S} e B_{3S} podem ser facilmente identificadas por RMN. No entanto, na presença das díades U_{3S} e $U_{2',3S}$ ou $A_{2g,3S}$ (ulvanobiurônico 3-sulfato tipo A substituído por ácido glucurônico em C2 da ramnose 3-sulfato) os espectros de RMN são mais complexos devido as diferentes possibilidades de distribuição das díades ao longo dos polissacarídeos (Lahaye e Robic, 2007).

A versatilidade química das ulvanas está relacionada com a presença de motivos estruturais específicos como os monossacarídeos ácidos, D-glucopiranurônico e L-idopiranurônico, a L-ramnose, a D-xilose e ainda as substituições por grupos éster de sulfato. Os monossacarídeos ácidos β -D-glucopiranurônico e α -L-idopiranurônico, podem ser facilmente modificados em função de seus grupos carboxílicos, principalmente por meio de reações com carbodiimidas (Schanté *et al.*, 2011a). Assim como as carboxilas representam sítios para modificações químicas em ulvanas, as unidades de β -D-xilose e ácido β -D-glucopiranurônico também podem ser alvo de funcionalizações, pois apresentam hidroxilas vicinais passíveis de oxidação por *m*-periodato (Guthrie, 1961).

Adicionalmente, as ulvanas apresentam sistema estrutural na forma de díades assemelhando-se aos dos glicosaminoglicanos presentes nos mamíferos, como a heparina e o condroitin sulfato. Ambas famílias de polissacarídeos são sulfatadas e contêm ácidos urônicos em suas estruturas, portanto ulvanas podem interagir com sistemas biológicos (Lahaye *et al.*, 1999; Leiro *et al.*, 2007).

Além dos grupos sulfato, os monossacarídeos também podem estar relacionados ao desenvolvimento de atividades biológicas das ulvanas, posto que domínios de reconhecimento para carboidratos dos receptores humanos, do tipo asialoglicoproteínas (ASGP-R), presentes nos hepatócitos, podem reconhecer α -L-ramnose, ácidos β -D-glucopiranurônico e α -L-idopiranurônico, além de β -D-xilose e β -D-xilose 2-sulfato (Massarelli *et al.*, 2007). Destaca-se ainda, que a identificação de

anticorpos anti- α -L-ramnose, em humanos, propõe novas abordagens em relação à imunoterapias que empregam monossacarídeos de α -L-ramnose (Chen *et al.*, 2011).

2.1.2.4 Propriedades biológicas das ulvanas

Ulvanas são polissacarídeos sulfatados que desempenham diferentes atividades biológicas. Em relação a citotoxicidade frente a células normais, a ulvana de *Ulva lactuca* foi testada frente a fibroblastos (L929) de linhagem murina. Após 24h de cultivo as células foram submetidas ao ensaio de MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) que avalia a atividade metabólica através da medida de atividade mitocondrial. Os resultados mostraram que a ulvana é citocompatível nas condições testadas e os autores sugeriram o uso deste polissacarídeo em aplicações biomédicas (Alves *et al.*, 2013b).

O maior número de estudos dos efeitos biológicos das ulvanas em sistemas celulares consiste na avaliação das atividades: antioxidante, para prevenção do estresse oxidativo e para o uso das ulvanas como droga protetora contra câncer e envelhecimento (Costa *et al.*, 2010; Qi *et al.*, 2006; 2010); anti-hiperlipidêmica: para a regulação do metabolismo de lipídeos e redução do risco de doenças cardíacas (Mayakrishnan *et al.*, 2013) e anticoagulante: como droga substituinte para heparina (Padmanaban *et al.*, 2013; Mao *et al.*, 2006; Harada e Maeda, 1998).

Em relação a atividade anticoagulante de ulvanas, esta é relativamente baixa quando comparada a outros tipos estruturais de polissacarídeos isolados de algas vermelhas ou pardas. Padmanaban e colaboradores (2013) testaram a atividade anticoagulante dos polissacarídeos de algas dos gêneros *Gelidium* (vermelha), *Sargassum* (parda) e *Ulva* (verde) e determinaram que os polissacarídeos da alga vermelha (agaranas) apresentaram o melhor potencial anticoagulante, seguidos dos obtidos das algas marrom (fucanas) e verde (ulvanas) em testes *in vitro*. Em relação às ulvanas, outros autores avaliaram a atividade anticoagulante destes polissacarídeos isolados de *U. fasciata* e *U. conglobata*, sendo que a ulvana da última espécie parece atuar potencializando o cofator II da heparina e na inibição da trombina (Govindan *et al.*, 2012b; Mao *et al.*, 2006).

Adicionalmente, ulvanas desempenham atividade antiviral, principalmente frente aos vírus influenza e HSV-1 (El-Baky *et al.*, 2009; Muto *et al.*, 1992; Song *et al.*, 2016), imunoestimulante, para o tratamento de doenças em que o sistema imune

encontre-se afetado (Leiro *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2004, 2006), elicitora em plantas como feijão e *Arabidopsis thaliana* (Paulert *et al.*, 2009; Jaulneau *et al.*, 2010; Freitas *et al.*, 2015) e antitumoral (El-Baky *et al.*, 2009; Kaeffer *et al.*, 1999; Abirami e Kowsalya, 2012).

As ulvanas apresentaram resultados promissores de atividade antitumoral tanto em testes *in vivo* quanto *in vitro*. A atividade antitumoral das ulvanas isoladas de *U. fasciata* foi testada contra linfoma ascítico de Dalton em camundongos na dose de 200 mg.kg⁻¹. A análise das alterações hematológicas e bioquímicas nos animais portadores do tumor antes e depois do tratamento indicaram que o extrato aquoso de ulvana aumentou os níveis de atividade antioxidante, os quais encontram-se reduzidos após a proliferação do linfoma (Abirami e Kowsalya, 2012). Testes *in vitro* realizados com a ulvana extraída de *U. fasciata* sugeriram que, em um tempo de exposição de 3 h, a concentração de 220 µg.mL⁻¹ foi suficiente para provocar 50% de morte celular à linhagem celular de linfoma ascítico de Dalton (Govindan *et al.*, 2012a). Adicionalmente, frações polissacarídicas obtidas de *U. lactuca* apresentaram inibição da proliferação de células de adenocarcinomas mamário (MCF-7) e hepatocelular (HepG2), refletindo potencial atividade antitumoral contra estes tipos tumorais (El-Baky *et al.*, 2009).

2.2 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS EM POLISSACARÍDEOS

As modificações em polissacarídeos visam alterar propriedades viscosantes, hidrofiliicidade/hidrofobicidade, geleificação, caráter iônico e capacidade queladora de metais (Yalpani, 1985; Cumpstey, 2013). Polissacarídeos também são utilizados como substratos para modificações, gerando produtos como: membranas permeáveis, matrizes para liberação controlada de fármacos, *gene delivery* (entrega gênica), matrizes para eletroforese e imobilização de enzimas e células (Baldwin e Kiick, 2010; Khan *et al.*, 2012; Mizrahy e Peer, 2012).

As modificações químicas têm despertado grande interesse na área biomédica, pois permitem a potencialização e/ou alteração da atividade biológica. A modificação de biopolímeros que possuem atividade biológica possibilita estudos detalhados de estrutura-atividade e leva ao aumento no conhecimento de mecanismos de ação e de subestruturas chave essenciais para determinada propriedade biológica (Peschel *et al.*, 2012).

Os polissacarídeos oferecem diferentes grupos para modificação química: ácidos carboxílicos, alvos de modificações nos polissacarídeos ácidos, como as pectinas, alginatos e ulvanas; grupos amino, nos polissacarídeos catiônicos constituídos por aminoaçúcares, como a quitosana; e as hidroxilas primárias e secundárias presentes em maior número em polissacarídeos neutros e pouco substituídos (Cumpstey, 2013).

2.2.1 Modificações químicas em hidroxilas

As hidroxilas primárias e secundárias constituem os principais alvos de modificação dos polissacarídeos e podem ser funcionalizadas por meio de sulfatação e esterificação ou ainda transformação da função álcool em outros grupos reativos, como amina e azida, entre outras.

A sulfatação química das hidroxilas produz polímeros aniônicos que apresentam possível aplicação como análogos da heparina (Papy-Garcia *et al.*, 2005), de forma que o posicionamento dos grupos sulfato está relacionado à atividade dos polissacarídeos. Neste contexto, os resultados obtidos por ensaios *in vitro* de aPTT com *kappa*-carragenanas quimicamente sulfatadas sugerem que sulfato no C2 das unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose e no C6 das unidades de β -D-galactopiranosose aumentam a atividade anticoagulante (Araújo *et al.*, 2013).

Qi e colaboradores (2012) utilizaram a alga verde *Ulva pertusa* para isolar e testar a capacidade anti-hiperlipidêmica *in vivo* das ulvanas nativa e quimicamente sulfatada (19,5 e 32,8% de sulfato, respectivamente). Os autores observaram que a ulvana quimicamente modificada apresentou efeito anti-hiperlipidêmico mais intenso que a ulvana nativa, promovendo a diminuição dos triglicerídeos e do LDL-colesterol em 28,1% ($p < 0,05$) e 28,4% ($p < 0,01$), respectivamente.

As hidroxilas também podem ser modificadas através da esterificação. Existem relatos de acetilação tanto de oligossacarídeos de *kappa*-carragenana quanto da ulvana obtida de *U. pertusa*, sendo que os polímeros acetilados apresentaram maior capacidade antioxidante quando comparados aos nativos, os quais, por sua vez, também apresentam atividade (Yuan *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 2006).

Reações de esterificação também podem ser utilizadas na produção de polímeros conjugados a drogas com reconhecidas atividades farmacológicas. Vlieghe e colaboradores (2002) introduziram o fármaco 3'-azido-3'-desoxi-desoxitimidina

(AZT) a moléculas de *kappa*-carragenana por ligação tipo éster utilizando succinato como ligante. O polímero modificado mostrou atividade anti-HIV quando células MT-4 foram incubadas com o fármaco antes da infecção, sugerindo que *kappa*-carragenana e AZT agem sinergicamente de forma a produzir o efeito (Vlieghe *et al.*, 2002).

Grupos carboxil e carbonil podem ser inseridos nas cadeias polissacarídicas a partir da oxidação de carbonos hidroxilados. Desta forma, a oxidação seletiva em C6, nos polissacarídeos neutros, origina polímeros com ácidos urônicos, cuja característica aniônica determina sua larga aplicação industrial. A oxidação de carbonos secundários hidroxilados ocorre com facilidade e pode ser conduzida em polissacarídeos que apresentam unidades piranosídicas, como celulose e amido, nos quais as hidroxilas nas posições C2 e C3 oferecem condição de oxidação (Bragd *et al.*, 2004).

2.2.1.1 Modificações químicas em hidroxilas secundárias com *m*-periodato

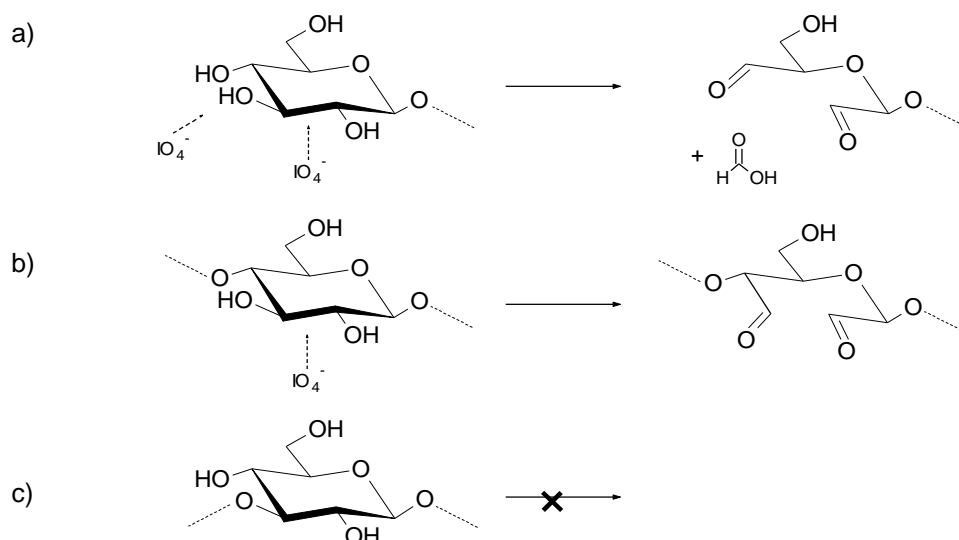
A modificação química de hidroxilas secundárias geralmente é realizada com *m*-periodato de sódio, o qual promove a quebra da ligação entre carbonos que apresentam hidroxilas vicinais, gerando um dialdeído (Guthrie, 1961). Os grupos aldeído apresentam maior reatividade e representam uma estratégia interessante para gerar polímeros que serão utilizados em sucessivas reações de modificação química.

Os íons periodato (IO_4^-) apresentam especificidade por dióis vicinais e estruturas correlatas como 2-hidroxialdeídos, 1,2-dicarbonilas, α -hidroxi e α -ceto ácidos, assim como α -amino álcoois. Os principais produtos (dialdeídos) obtidos para polissacarídeos (1 \rightarrow 2), (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4) e (1 \rightarrow 6) ligados e para extremidades não redutoras são representados na FIGURA 3, utilizando a β -D-glucose como exemplo. Para que ocorra a oxidação é necessário que as hidroxilas estejam orientadas nas posições equatorial-equatorial ou axial-equatorial. Hidroxilas vicinais na posição axial-axial não são capazes de reagir porque a estrutura rígida não permite a formação do complexo intermediário cíclico com o periodato (Kristiansen *et al.*, 2010).

O processo de oxidação com periodato tem sido realizado em diferentes tipos de polissacarídeos como alginato, quitosana, ácido hialurônico, laminaranas (resistentes), celulose, amidos, glicosaminoglicanos, mananas e xilanas. Kang e colaboradores (2002) utilizaram alginato para promover a oxidação de C2 e C3 utilizando periodato de sódio. Na etapa subsequente os aldeídos foram ligados a alquil

aminas de cadeia longa através de reações de aminação redutiva. A estratégia gerou derivados do alginato mais hidrofóbicos, que podem ser empregados na imobilização de enzimas, adsorção de proteínas e imobilização de células (Kang *et al.*, 2002).

FIGURA 3 - PRINCÍPIO GERAL DA OXIDAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS COM PERIODATO (IO_4^-) ILUSTRADO POR UNIDADES DE β -D-Glcp



No terminal não redutor ocorre dupla oxidação entre C2 e C3 e entre C3 e C4, respectivamente, com liberação de ácido fórmico (a); em monossacarídeos (1→4) ligados a oxidação ocorre entre C2 e C3 (b); os monossacarídeos (1→3) ligados são resistentes a oxidação (c). FONTE: Kristiansen *et al.*, 2010.

2.2.2 Modificações químicas com grupos amino: aminação redutiva

Nas modificações químicas de polissacarídeos, a reação do tipo aminação redutiva constitui uma ferramenta frequentemente utilizada para promover ligação de diferentes compostos amino-funcionalizados ou aminoaçúcares aos grupos aldeído (Yaich *et al.*, 2015). Estas reações são versáteis e requerem um agente redutor além de condições suaves de temperatura e pH, sendo eficazes em solventes aquosos. Por isso, podem ser aplicadas aos diversos tipos de polissacarídeos (Yalpani, 1980).

Aminas reagem com eletrófilos para formar amidas, sais quaternários de amônio ou iminas (bases de Schiff). As reações podem ser realizadas em meio aquoso e não requerem proteção das hidroxilas dos polissacarídeos, em função da diferença de reatividade entre os átomos de oxigênio e nitrogênio (Cumpstey, 2013).

A reação de aminação redutiva prevê, primeiramente, a formação de um intermediário hemiaminal, produto da adição de um grupo carbonílico a amônia ou

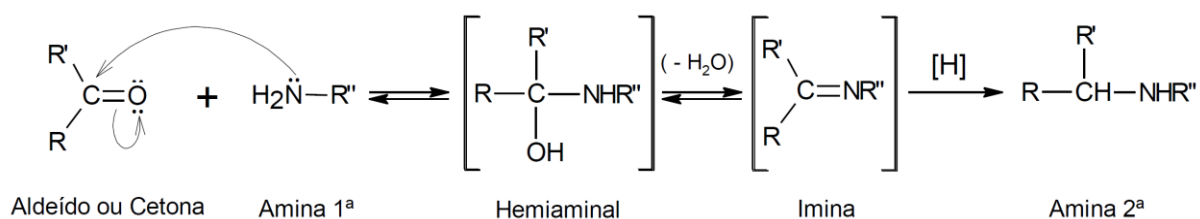
uma amina primária ou secundária. O intermediário hemiaminal de aminas primárias sofre desidratação e forma um intermediário imina, enquanto aminas secundárias originam um intermediário enamina. Na aminação redutiva de aminas primárias em condições reacionais, geralmente, neutras a levemente ácidas, o intermediário imina é protonado e forma um íon imínio, o qual é reduzido pelo agente redutor e origina a amina alquilada (FIGURA 4) (Abdel-Magid *et al.*, 1996; Solomons e Fryhle, 2011).

Há evidências de que pode ocorrer também a redução direta do intermediário hemiaminal ao produto. A reação de aminação redutiva direta ocorre quando o composto carbonílico e a amina, na presença do agente redutor, formam o produto sem que se originem os intermediários imina e imínio (Tadanier *et al.*, 1981).

Borch *et al.* (1971) afirmam que o pH ótimo para aminação redutiva é entre 6-8, contanto que exista quantidade suficiente de hidrogênios para a formação do íon imínio. No entanto, as variações no pH do meio reacional podem influenciar na velocidade da reação (Abdel-Magid *et al.*, 1996).

O agente redutor cianoboroidreto de sódio (NaBH_3CN) apresenta grande estabilidade em soluções ácidas ($\sim\text{pH } 3$) e promove a redução efetiva de aldeídos e cetonas em pH 3-4, mas esta redução torna-se muito lenta em altos valores de pH (Abdel-Magid *et al.*, 1996; Borch e Durst, 1969).

FIGURA 4 - MECANISMO DE AMINAÇÃO REDUTIVA COM AMINAS PRIMÁRIAS



FONTE: Solomons e Fryhle, 2002.

Destaca-se que os processos de oxidação com periodato e aminação redutiva também compõem uma abordagem inédita na modificação química das ulvanas, tendo sido descritos pela primeira vez no presente trabalho. A formação de grupos aldeído por meio do processo de oxidação da ulvana com periodato permite promover reações de aminação redutiva que ligam covalentemente grupos amino a sítios específicos na estrutura polissacarídica da ulvana, os quais são determinados pelo padrão de oxidação com periodato.

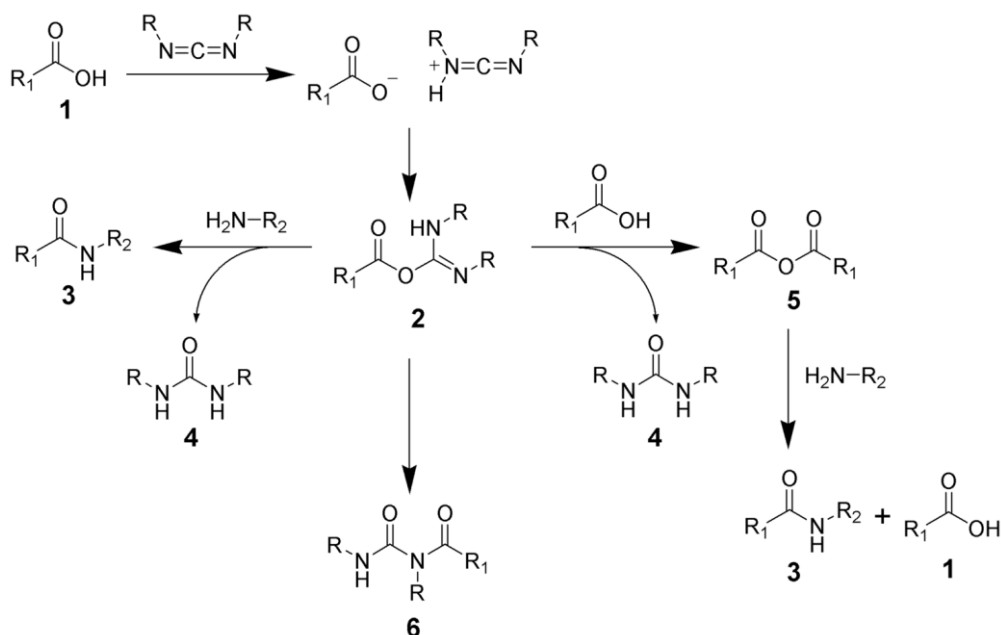
2.2.3 Modificações químicas em ácidos carboxílicos: amidação

A reatividade da função carboxila permite reações de esterificação e amidação. Assim, a partir da ligação de um álcool ou de uma amina pode ser conduzida a formação de derivados éster ou amida, respectivamente, com auxílio de derivados da carbodiimida, como a *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC). Estes derivados reagem com a carboxila e são bons grupos abandonadores, cedem facilmente ao ataque nucleofílico do álcool ou da amina (Schanté *et al.*, 2011a).

A modificação de polissacarídeos ácidos pode ser realizada através da amidação dos ácidos urônicos. A formação de grupos amida ocorre em meio aquoso sob condições suaves de pH e temperatura e na presença de carbodiimidas (Khorana, 1953). De acordo com a FIGURA 5, a reação inicia-se pela ionização da carboxila (**1**) e protonação da carbodiimida, a qual sofre o ataque do ânion carboxílico e forma um intermediário *O*-acilisoureira instável (**2**). O intermediário *O*-acilisoureira (**2**) pode sofrer rearranjo via deslocamento cíclico de elétrons (ver FIGURA 31, página 122) e formar subproduto *N*-acilureia (**6**), ou ainda pode ser acidificado e produzir o intermediário *O*-acilisoureira protonado, o qual pode ser convertido a amida (**3**) pelo ataque de uma amina primária (Kurzer e Douraghi-Zadeh, 1967; Kuo *et al.*, 1991; Schanté *et al.*, 2011a). O intermediário *O*-acilisoureira também pode ser atacado por outro grupo carboxila e formar um anidrido (**5**), o qual então pode sofrer o ataque da amina e originar uma amida (**3**), regenerando um dos carboxilatos (**1**) (Khorana, 1953). Reações com aminas primárias e *O*-acilisoureira (**2**) também podem produzir ureia (**4**).

O resultado das reações de esterificação e amidação podem oferecer novos grupos químicos para modificações sequenciais. Assim, a amidação do ácido carboxílico com uma diamina constitui uma das estratégias inéditas de modificação química da ulvana, a ser utilizada no presente trabalho. O resultado da amidação com uma diamina equivale à inserção de uma extremidade de amino livre, capaz de participar de reações de aminação redutiva posteriores.

FIGURA 5 - MECANISMO DE AMIDAÇÃO DE CARBOXILA VIA CARBODIIMIDA



FONTE: Copyright (C) 2000, 2001, 2002 Free Software Foundation, Inc.
51 Franklin St, Fifth Floor, Boston, MA 02110-1301 USA.

A amidação de carboxilas é realizada principalmente nos polissacarídeos ácidos alginato e ácido hialurônico (Siddhanta *et al.*, 2015; Schanté *et al.*, 2011b). A adição de grupos fluorogênicos via amidação induzida por micro-ondas resultou em derivados de alginato-amida com potenciais aplicações nas áreas de sensores e limpeza de ambientes aquosos pela capacidade de ligação à metais pesados (Chhatbar *et al.*, 2011; Sanandiya e Siddhanta, 2013). Dentre os métodos de amidação, a amidação utilizando EDC e NHS (*N*-hidroxisuccinimida) é mais comumente utilizada em polissacarídeos ácidos. A amidação de alginato com EDC e NHS originou derivados alginatos com diferentes propriedades reológicas e capazes de ligar Hg²⁺ e Cr³⁺ (Chhatbar *et al.*, 2012; Chejara *et al.*, 2013; Saha *et al.*, 2012). Schanté e colaboradores (2011b) prepararam derivados de *N*-alanil-hialuronamida por meio de três estratégias de amidação, empregando, (1) EDC/NHS em água, (2) CDMT (2-cloro-dimetoxi-1,3,5-triazina) e NMM (*N*-metilmorfolina) em água e acetonitrila (3:2) e (3) CMPI (iodeto de 2-cloro-1-metilpiridínio) em dimetilformamida. Os derivados *N*-alanil-hialuronamida mostraram-se resistentes à digestão enzimática e originaram soluções com viscosidades semelhantes aos ácidos hialurônicos com cadeias de tamanhos similares.

2.2.4 Modificações químicas por meio de hidrólise: produção de oligossacarídeos a partir de galactanas de algas vermelhas

Nas galactanas de algas vermelhas estão presentes as unidades de 3,6-anidro- α -galactose e seu caráter lábil em meio ácido proporcionou o desenvolvimento de diferentes estratégias de hidrólise. Assim, as distintas condições de hidrólise determinam os diferentes tipos de oligossacarídeos produzidos.

A metanólise parcial surgiu como opção para evitar a perda das unidades de 3,6-anidro- α -galactose e origina oligossacarídeos com unidades terminais de 3,6-anidro- α -galactose dimetilacetal. O metanol atua como nucleófilo e promove a metanólise das ligações 3,6-anidrogalactosídicas de maneira preferencial (Araki e Hirase, 1954).

Hidrólises enzimáticas também previnem a perda das unidades de 3,6-anidro- α -galactose e podem fornecer oligossacarídeos redutores e oligossacarídeos redutores na forma de aldeído hidratado, ou ainda oligossacarídeos contendo 3,6-anidro- α -galactose como terminal não redutor (Rochas *et al.*, 1986; Young *et al.*, 1978; De Ruiter e Rudolph, 1997).

O processo de hidrólise oxidativa com H_2SO_4 0,25 mol.L⁻¹ na presença de bromo foi desenvolvido por Penman e Rees (1973) para o estudo de polissacarídeos sulfatados com alta proporção de 3,6-anidrogalactose. Nestas condições as ligações 3,6-anidrogalactosídicas são quebradas e oxidadas pelo bromo a ácido 3,6-anidro-galactônico. Outra estratégia para evitar a perda das unidades de 3,6-anidro- α -galactose foi a adição do complexo redutor borano 4-metil-morfolina durante o processo de hidrólise. Este complexo redutor é resistente ao meio ácido e permite obter oligossacarídeos na forma alditol, pois a redução ocorre assim que os oligossacarídeos são liberados pela hidrólise ácida (Garegg *et al.*, 1988).

As condições da hidrólise ácida são determinadas pelos tipos de unidades monossacarídicas, anel e configuração das ligações glicosídicas (Adams, 1965).

Agaranas hidrolisadas em condições suaves originam oligossacarídeos com número par de unidades, análogos aos obtidos por degradação enzimática, rendendo principalmente agarobiose na forma de aldeído hidratado (Izumi, 1973).

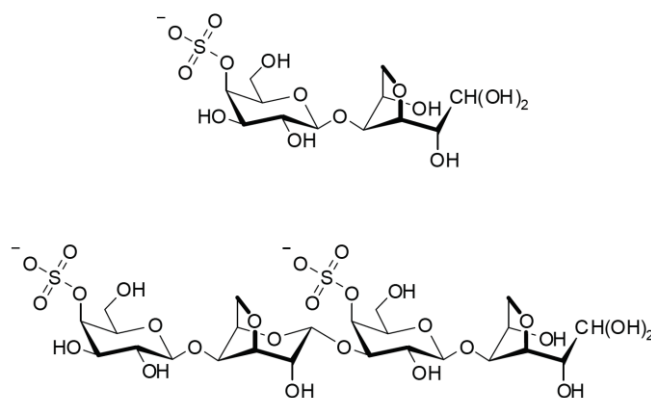
No entanto, condições de hidrólise mais intensa promovem a degradação das unidades de 3,6-anidrogalactose, e originam oligossacarídeos com número ímpar de

unidades monossacarídicas. Assim as extremidades são sempre unidades A na forma de terminais redutores e não redutores (Yu *et al.*, 2002).

Assim, processos de hidrólise parcial para formação de oligossacarídeos e/ou fragmentos de baixa massa molar compreendem outro destaque na modificação química de polissacarídeos. Quando da presença de extremidades redutoras, estas moléculas podem ser seletivamente manipuladas para funcionalização e utilização em etapas subsequentes de modificação química.

Condições suaves de hidrólise ácida com TFA 0,1 mol.L⁻¹ a 65 °C permitiram a obtenção de oligossacarídeos estáveis de agarose e *kappa*-carragenana, os quais apresentam extremidades redutoras de 3,6-anidrogactose na forma de aldeído hidratado (FIGURA 6) (Ducatti *et al.*, 2011).

FIGURA 6 - OLIGOSSACARÍDEOS REDUTORES OBTIDOS POR HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DE *KAPPA*-CARRAGENANA COMERCIAL



FONTE: Ducatti *et al.*, 2011.

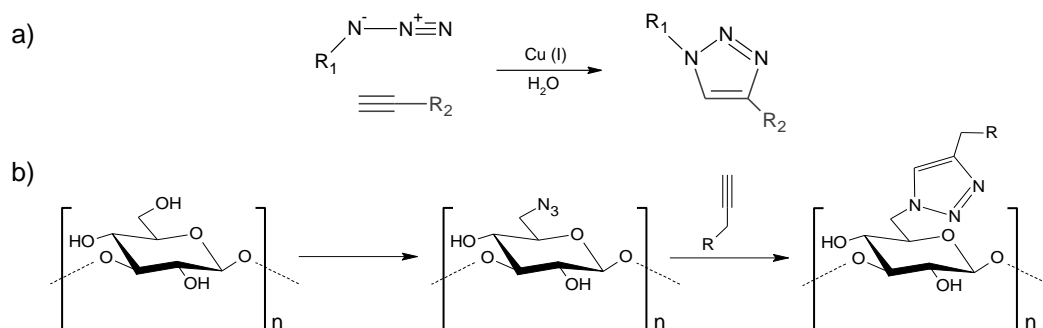
A produção de oligossacarídeos por meio de hidrólise enzimática ou hidrólise ácida parcial a partir de galactanas de algas vermelhas tem sido enfatizada devido à bioatividade que estas moléculas apresentam. Agaro-oligosacarídeos são capazes de diminuir a produção da citocina TNF α , apresentando propriedade anti-inflamatória (Kobayashi *et al.*, 2003). Propriedades antialérgica, carcinostática e de inibição da apoptose foram também relatadas. As galactanas podem ser degradadas quimicamente mantendo o padrão de sulfatação do polissacarídeo de origem. Estes oligossacarídeos de carragenanas mostraram atividade antitumoral *in vivo* e *in vitro*, além de capacidade de inibição da angiogênese (Haijin *et al.*, 2003). A bioatividade não está relacionada apenas com o grau de sulfatação da porção glicídica, mas, sobretudo, com a regioquímica dos grupos sulfato.

2.2.5 Modificações químicas via *click chemistry*

As hidroxilas presentes nas cadeias polissacarídicas podem ser transformadas em outras funções químicas, como amina e azida. Com a inserção de grupos com reatividades diferentes das hidroxilas existe a possibilidade de manipulação ortogonal dos polissacarídeos, o que permite a semissíntese de polímeros com características muito específicas. Este aspecto destaca as reações realizadas por *click chemistry*.

O termo *click chemistry* é utilizado para descrever reações simples, de grande aplicabilidade, alto rendimento, estereoespecíficas e que formam produtos de fácil purificação (Meldal e Tornøe, 2008). Uma reação que possui estes critérios é a variação da reação de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen que utiliza cobre como catalisador. A reação pode ser conduzida em água a temperatura ambiente e utiliza grupos azida e alquino como substratos para sintetizar triazóis 1,4 dissustituídos (FIGURA 7a) (Elchinger *et al.*, 2011).

FIGURA 7 - REAÇÃO DE CICLOADIÇÃO COM A FUNÇÃO AZIDA



Cicloadição alquil-azida catalisada por Cu (I), uma variação da Reação de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen (a); Glucana funcionalizada com grupo azida submetida a cicloadição alquil-azida catalisada por Cu (I), resultando em compostos ligados a diferentes radicais R (β -lactosídeo, pireno, ferroceno e porfirina) (b). FONTE: Elchinger *et al.*, 2011; Hasegawa *et al.*, 2006.

Hasegawa e colaboradores (2006) inseriram de forma seletiva a função azida no C6 de uma glucana β -(1 \rightarrow 3) por meio de um intermediário bromo alquil. O polissacarídeo contendo a função azida foi submetido a reações de cicloadição utilizando diferentes moléculas funcionalizadas com os radicais R (β -lactosídeo, pireno, ferroceno e porfirina) (FIGURA 7b). Os polímeros produzidos apresentam potencial aplicação nos campos de *gene delivery* (entrega gênica) e biomateriais.

2.2.6 Modificações químicas que originam redes integradas de polissacarídeos

Ainda no contexto de modificações de polissacarídeos destacam-se três formas de combinação de polímeros para obtenção de redes integradas ou ainda copolímeros: *curing*, quando ocorrem interações físicas entre polímeros produzindo camadas integradas; *blending*, que representa a mistura entre duas ou mais moléculas poliméricas e *grafting/crosslinking*, que geram interações covalentes entre polímeros, formando copolímeros ou estruturas em rede (Bhattacharya e Misra, 2004).

Copolímeros anfifílicos foram produzidos a partir da inserção de metilcelulose de baixa massa molar aos polissacarídeos quitosana e hialuronana-ADH, uma hialuronana previamente aminada com diidrazida adípica (ADH). As moléculas de metilcelulose ligam-se covalentemente aos grupos amino presentes, tanto na quitosana quanto na hialuronana-ADH, por meio de aminação redutiva. A reação de aminação redutiva ocorre entre o grupo hemiacetal (aldeído redutor) da metilcelulose e os grupos amino presentes ao longo da estrutura dos outros polissacarídeos, na presença do agente redutor cianoboroidreto de sódio (NaBH_3CN). Os copolímeros resultantes foram caracterizados por meio de análise elementar de nitrogênio e RMN de ^1H e analisados em relação às suas propriedades reológicas. A autora destaca que na condição de pH 6 e presença de NaBH_3CN a redução dos íons imínio é mais rápida quando comparada a redução dos grupos carbonílicos, o que permite a reação *in situ* da amina com a carbonila. O comportamento reológico dos copolímeros foi aperfeiçoado em comparação com a mistura equivalente de seus constituintes (Rinaudo, 2011).

Desta forma, a produção de copolímeros a partir de polissacarídeos também pode ser realizada no sentido de formar estruturas em rede para produção de biomateriais (Oezyuerek *et al.*, 2009) ou ainda nanopartículas (Mizrahy e Peer, 2012) com diversas aplicações biotecnológicas. Estas modificações trazem perspectivas de novas empregabilidades para polissacarídeos comerciais com aplicações já bem estabelecidas (Rinaudo, 2011), bem como para polissacarídeos como as ulvanas, as quais apresentam potencial aplicação na produção de biomateriais 2D e 3D com diferenciadas aplicações biotecnológicas (Alves *et al.*, 2012b; Alves *et al.*, 2013c).

2.3 TENDÊNCIAS NA ÁREA DE MODIFICAÇÕES QUÍMICAS EM POLISSACARÍDEOS

O futuro da modificação química em polímeros é caracterizado pela contínua adaptação de suas estruturas e propriedades por meio da expansão de métodos químicos e biológicos, que visem controlar os processos de melhoramento e síntese das moléculas de interesse (Baldwin e Kiich, 2010). Destaca-se, ainda, o crescente interesse pela utilização de compostos de fontes renováveis e por processos sustentáveis (Cumpstey, 2013).

Neste contexto, nota-se o aumento de estudos que utilizam polissacarídeos como blocos de construção para o desenvolvimento de biomateriais, os quais podem ser utilizados na produção de nanopartículas para liberação de fármacos de maneira alvo-específica e controlada; hidrogéis com propriedades pró-angiogênicas para implantes; membranas e estruturas 3D que mimetizam a matriz extracelular e podem ser utilizadas para diferenciação, proliferação de células e engenharia de tecidos, bem como curativos inteligentes que participam do processo de cicatrização; entre outros (Mizrahy e Peer, 2012; Alves *et al.*, 2012a; Zieris *et al.*, 2010; Yang *et al.* 2015; Han *et al.*, 2015; Barros *et al.*, 2013).

Partículas nanocarreadoras podem ser desenvolvidas com o intuito de liberar fármacos em sítios específicos, como descrevem Han e colaboradores (2015). Estes autores desenvolveram nanocarreadores anfifílicos com copolímeros de ácido hialurônico (HA) e específicos para ação em células tumorais. As nanopartículas sofrem reações de redução no ambiente celular porque apresentam revestimento de HA com ligações dissulfeto. Doxorubicina, um modelo de medicamento antitumoral, foi carregada pelas nanopartículas de liberação lenta em condições de pH fisiológico. O aumento na liberação de doxorubicina ocorreu na presença de glutathione, um tripeptídeo capaz de reduzir as pontes dissulfeto no citoplasma celular. Além disso, as nanopartículas também foram capazes de liberar o fármaco dentro do núcleo das células SCC7, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, resultando em uma melhor eficácia do efeito antitumoral (Han *et al.*, 2015).

O principal problema das terapias com biomateriais desenvolvidos pela engenharia de tecidos está relacionada à escassa vascularização dos sistemas. Uma das formas para solucionar o problema constitui na construção de biomateriais capazes de induzir uma resposta angiogênica localizada, fornecendo estímulo para

formação de novos capilares sanguíneos, a partir dos vasos microvasculares pré-existentes, após a implantação do tecido no alvo. Nesta linha de pesquisa foram desenvolvidos hidrogéis de heparina com PEG-ramificados, contendo grupos negativos *N*- e *O*-sulfato, capazes de interagir com os resíduos básicos de arginina e lisina constituintes dos fatores de crescimento FGF-2 e VEGF. A cultura de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) demonstrou a interação entre a apresentação dos fatores de crescimento, as características adesivas e a elasticidade das matrizes de gel no comportamento celular, permitindo identificar condições pró-angiogênicas (Zieris, *et al.*, 2010). A exemplo do uso da heparina como biomaterial para produção de hidrogéis com propriedades pró-angiogênicas (Zieris, *et al.*, 2010), destaca-se que a presença de ácidos glucurônico e idurônico nas ulvanas sugere similaridade com os glicosaminoglicanos de mamíferos, e ainda indica que as ulvanas podem estar envolvidas nos processos de adesão e coesão da parede celular (Quemener *et al.*, 1997; Lahaye *et al.*, 1999).

As ulvanas apresentam motivos estruturais que viabilizam o desempenho de atividades biológicas, como citado previamente, em função da presença dos monossacarídeos raros L-ramnose e ácido L-idurônico. Adicionalmente, outros monossacarídeos constituintes tais como ácido D-glucurônico e xilose são de interesse para realização de modificações químicas em ulvanas. Assim, a importância e o interesse por essas biomoléculas refletem no número de patentes motivadas pela diversidade de aplicações que as ulvanas representam, desde a indústria de cosméticos, alimentos e farmacêutica, até no desenvolvimento de novos biomateriais (Alves *et al.*, 2013a).

Neste contexto, novos biomateriais 2D e 3D, têm sido propostos a partir da modificação química de ulvanas, como membranas poliméricas ou ainda complexos de polieletrólitos entre ulvanas e polissacarídeos carregados positivamente, ou ainda hidrogéis termoresponsivos. Estes biomateriais apresentam potenciais aplicações em diferentes áreas biotecnológicas. A seguir são descritos alguns exemplos de modificações químicas em ulvanas, as quais agregam valor biotecnológico a estes polissacarídeos.

Membranas poliméricas 2D de ulvana moldadas por solvente foram produzidas após a funcionalização da ulvana com 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDDE) em meio básico. A ulvana reticulada com BDDE perde a solubilidade em água e permanece estável em condições fisiológicas. As membranas foram caracterizadas

por espectroscopia de infravermelho e microscopia eletrônica de varredura. As membranas apresentaram alta capacidade de absorção de água (~1800% da sua massa inicial) e foram capazes de atuar liberando ~49% de dexametasona de forma constante, seguida por uma liberação mais lenta e contínua por 14 dias. Os autores sugerem que as ulvanas podem compor curativos inteligentes ou ainda veículos de liberação controlada de drogas (Alves *et al.*, 2012b).

Adicionalmente, membranas 2D puderam ser produzidas por meio de complexos de polieletrólitos através da combinação de ulvana e quitosana, polímeros de caráter aniônico e catiônico, respectivamente. A combinação de dois polímeros de cargas opostas produziu interações eletrostáticas, formando estruturas supramoleculares (fibras e nanofibras) e membranas estáveis. A presença de ambos polissacarídeos, quitosana policatiônica e ulvana polianiônica, foi sugerida pelas análises de espectroscopia de infravermelho com reflexão total atenuada (ATR-FTIR). A citocompatibilidade dos polissacarídeos e dos polieletrólitos formados foi verificada por microscopia de fluorescência. Os resultados mostraram que as ulvanas e as membranas de ulvana/quitosana promoveram adesão e proliferação de osteoblastos 7F2, mantendo a viabilidade e a morfologia celulares. Os padrões de porosidade das membranas puderam ser alterados ao variar a proporção de polissacarídeos utilizados na formação dos complexos. As estruturas de nanofibras das membranas construídas mimetizam a porção fibrosa da matriz extracelular e podem ser responsáveis pela adesão dos osteoblastos. Assim, sugere-se que estes complexos de polieletrólitos possam ser utilizados como “*scaffolds*” em função de suas propriedades de adesão celular (Toskas *et al.*, 2012).

Com o intuito de produzir biomateriais 3D, Barros e colaboradores (2013) promoveram a inserção de grupos carboximetil às hidroxilas da ulvana extraída de *U. lactuca* por meio da carboximetilação com ácido monocloroacético. No mesmo estudo também foi realizada a carboximetilação da quitosana isolada do gládio da lula *Loligo forbesis*. Os graus de substituição foram estimados, respectivamente, em ~98% e ~87%, por meio da análise do aumento da massa molar ponderal média determinada por GPC (cromatografia de gel permeação). A reação de inserção de grupos carboximetil foi confirmada por espectroscopia de infravermelho e quantificada por meio de titulação condutimétrica e RMN de ¹H. Misturas da ulvana e da quitosana carboximetiladas foram testadas na formulação de cimentos ósseos de ionômero de vidro, livres de ácido poliacrílico. Testes mecânicos e de bioatividade *in vitro* indicaram

que a inclusão da ulvana carboxilada à formulação do cimento ósseo melhorou sua performance mecânica e gerou cimentos não tóxicos (Barros *et al.*, 2013).

Hidrogéis termoresponsivos de ulvanas também podem apresentar aplicações biomédicas. A propriedade termoresponsiva da ulvana foi obtida por meio da inserção do componente termosensível poli(*N*-isopropilacrilamida) à cadeia polissacarídica. Primeiramente as hidroxilas foram adicionadas de grupos acrilóil, os quais funcionam como macroiniciadores da reação de polimerização radicalar de *N*-isopropilacrilamida, a qual foi induzida por radiação UV. As propriedades termogeleificantes do copolímero produzido foram verificadas por análises térmicas e reológicas. Os resultados demonstram que a transição sol-gel do copolímero ocorre a 30-31 °C, sugerindo que o copolímero de ulvana pode ser utilizado como sistema de formação de hidrogel *in situ* nas aplicações biomédicas (Morelli *et al.*, 2016).

O aperfeiçoamento da aplicabilidade de polissacarídeos com utilidades bem estabelecidas pode ser alcançado a partir de modificações químicas. Adicionalmente, a exemplo dos estudos citados acima, as modificações químicas permitem produzir moléculas com propriedades inéditas, ou ainda propor moléculas em substituição àquelas que não pertencem a rotas sustentáveis de obtenção, produção e utilização.

As ulvanas destacam-se em relação a sua versatilidade química e a sua bioatividade, motivos pelos quais estas moléculas têm sido cada vez mais estudadas e utilizadas em modificações químicas para produção de biomateriais com possíveis aplicações biomédicas (Morelli *et al.*, 2016).

Desta forma, tendo em vista a biodegradabilidade e a pronta obtenção de polissacarídeos a partir de algas marinhas, as quais constituem fonte renovável destes polímeros naturais, o presente trabalho explora o potencial das ulvanas para obtenção de derivados inéditos por meio de abordagens, também inéditas, de modificação química e semissíntese de polissacarídeos híbridos sulfatados.

3 JUSTIFICATIVA

Modificações químicas em polissacarídeos, o estudo de sua estrutura química e a avaliação das suas atividades biológicas, justificam-se tendo em vista seus aspectos: (1) Econômico: pela ampla utilização de polissacarídeos em diversos setores industriais; (2) Ambiental: que compreende a sustentabilidade em consequência da disponibilidade de polissacarídeos biodegradáveis obtidos de algas, as quais constituem fontes renováveis de biomoléculas interessantes com estruturas químicas particulares; (3) Biológico: que demonstra inúmeras interações biológicas entre polissacarídeos e a maquinaria celular de diferentes organismos e, portanto, diversas propriedades biológicas para estas biomoléculas; (4) Químico: que inclui a diversidade estrutural e a necessidade da caracterização química dos polissacarídeos, bem como as diversas possibilidades de modificações químicas destas moléculas; (5) Biotecnológico: em função do crescente interesse pelos polissacarídeos na biologia molecular, química industrial e engenharia bioquímica.

Estudos do grupo de pesquisa em Glicobiologia Estrutural de Carboidratos de Algas Marinhas (GLICAM, UFPR), do qual a autora é parte integrante, demonstraram que diferentes tipos de polissacarídeos sulfatados isolados de macroalgas marinhas apresentam importantes atividades biológicas, as quais estão relacionadas com particularidades estruturais do polímero nativo ou quimicamente modificado (Duarte *et al.*, 2004; Talarico *et al.*, 2004, 2005, 2007, 2011; Araújo *et al.*, 2013; Mendes *et al.*, 2014; Ropellato *et al.*, 2015; Freitas, 2015; Silva *et al.*, 2015, 2016).

Assim, polissacarídeos obtidos de algas destacam-se por apresentar ampla diversidade estrutural bem como atividades biológicas diversas, podendo ser modificados de maneira a expandir suas aplicabilidades em diversas áreas biotecnológicas. Neste contexto, o presente trabalho utilizou abordagens inéditas na modificação química de ulvanas, além de promover a semissíntese de polissacarídeos híbridos sulfatados a partir de ulvanas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

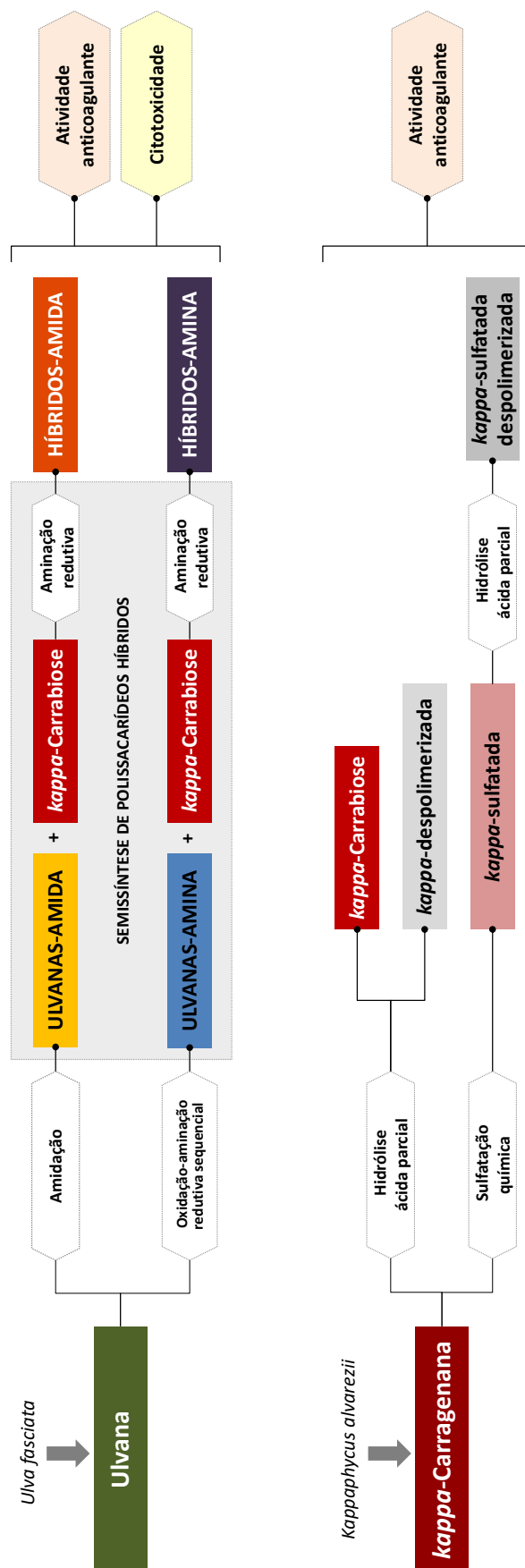
O objetivo geral do presente trabalho foi a obtenção de polissacarídeos modificados derivados da ulvana da alga verde *Ulva fasciata*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amidação das carboxilas da ulvana;
- Clivagem oxidativa seguida de aminação redutiva da ulvana;
- Semissíntese de polissacarídeos híbridos utilizando a *kappa*-carrabiose;
- Caracterização das modificações químicas por métodos químicos e espectroscópicos;
- Avaliação da citotoxicidade e da atividade anticoagulante.

5 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

FIGURA 8 - ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DOS DERIVADOS MODIFICADOS DA ULVANA DE *U. fasciata*



A ulvana extraída da alga verde *Ulva fasciata* foi modificada quimicamente por processos de amidação e clivagem oxidativa seguida de aminação redutiva originando, respectivamente, ulvanas-amida e ulvanas-amina. As reações de semissíntese dos polissacarídeos híbridos-amida e híbridos-amina foram realizadas a partir de aminações redutivas entre a *kappa*-carrabiose e as ulvanas-amida e ulvanas-amina, respectivamente. A *kappa*-carragenana extraída da alga vermelha *Kappaphycus alvarezii* foi hidrolisada por meio de hidrólise ácida parcial para obtenção do dissacarídeo *kappa*-carrabiose. Adicionalmente, foram realizadas hidrólises ácidas parciais a partir da *kappa*-carragenana nativa (*kappa*-carragenana) e do seu derivado sulfatado quimicamente (*kappa*-sulfatada) para obtenção de despolimerizados (*kappa*-despolimerizada e *kappa*-sulfatada despolimerizada). A atividade anticoagulante e a citotoxicidade das moléculas obtidas foram avaliadas *in vitro*.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 MATERIAL

Os exemplares da alga verde *Ulva fasciata* Delile (Clorophyta) foram coletados em Bombinhas-SC e identificados pela Profa. Dra. Franciane Maria Pellizzari (UNESPAR, Paranaguá-PR). A alga vermelha *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C.Silva (Rhodophyta), foi cultivada e cedida pelo Núcleo de Pesquisa do Litoral Norte, em Ubatuba, São Paulo (Paula *et al.*, 1999). A heparina não fracionada (Callbiochem®, 192,0 UI.mg⁻¹) e o *m*-periodato de sódio foram adquiridos da Merck (Alemanha). *N,N*-dimetilformamida anidra (DMFa), 2-metil-2-butenol, complexo piridina-trióxido de enxofre, cloridrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilcarbodiimida (EDC), *N*-hidroxisuccinimida (NHS), 1,3-diaminopropano¹ (DAP), 1,6-diaminoexano (HMD) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). *n*-Pentilamina (Am), foi adquirida da Acros Organics. Todos os outros reagentes químicos que foram utilizados são de grau analítico.

6.2 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS: OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DE ULVANA (F) E K-CARRAGENANA (K)

Os exemplares da alga verde *Ulva fasciata* foram lavados em água corrente, secos em estufa a 50 °C, moídos em moinho de faca e então submetidos à extração aquosa (6% m/v) à 80 °C sob agitação mecânica. Após centrifugação, ao sobrenadante foi adicionado etanol (3 volumes) e acetato de potássio. O precipitado etanólico foi ressolubilizado em água, concentrado à pressão reduzida em evaporador rotativo, dialisado sequencialmente contra água destilada, NaCl 1 mol.L⁻¹ e água destilada (MWCO 12-14 kDa), e liofilizado, originando fração polissacarídica F. O resíduo de alga foi submetido a mais duas extrações aquosas, como descrito acima, originando assim as frações F2 e F3. A fração polissacarídica F foi utilizada nas modificações químicas descritas neste trabalho.

¹ No presente trabalho optou-se por adotar a nomenclatura trivial para descrever os reagentes utilizados e os produtos obtidos. Destaca-se que, de acordo com as atuais regras de nomenclatura da IUPAC, a diamina trivialmente referida como 1,3-diaminopropano deve ser nomeada por propano-1,3-diamina. A nomenclatura IUPAC pode ser verificada em FAVRE, H. A.; POWELL, W. H. *Nomenclature of organic chemistry: IUPAC recommendations and preferred names* (Blue Book), Royal Society of Chemistry, 2013.

A alga *Kappaphycus alvarezii* foi lavada em água corrente, seca a temperatura de 60°C e depois tratada com KOH 6% por 48 h em temperatura ambiente, lavada novamente em água corrente e seca a 60 °C (Paula *et al.*, 1999). A alga seca e moída foi submetida à extração com tampão fosfato 0,025 mol.L⁻¹, pH 7,0 (2% m/v) sob agitação mecânica, a 65 °C, por 5 h. O extrato obtido foi centrifugado e ao sobrenadante foi adicionado etanol (3 volumes). Após centrifugação o precipitado foi ressolubilizado em água, concentrado à pressão reduzida em evaporador rotativo, dialisado sequencialmente contra água destilada, NaCl 1 mol.L⁻¹ e água destilada (MWCO 12-14 KDa) e então liofilizado, originando a fração polissacarídica K. A segunda extração, nas mesmas condições, originou a fração K2.

6.3 TRATAMENTO COM CLORETO DE POTÁSSIO

Uma porção da fração K foi solubilizada em água destilada (0,3% m/v), à esta solução foi adicionado KCl sólido (concentração final 0,1 mol.L⁻¹) sob agitação por 3 h, permanecendo em repouso por 16 h a 4 °C. A centrifugação (12.000 g por 20 minutos) do extrato polissacarídico tratado originou um precipitado e um sobrenadante, os quais foram dialisados contra água destilada, NaCl 1 mol.L⁻¹, água destilada e então liofilizados. Desta forma o tratamento com KCl 0,1 mol.L⁻¹ originou a fração K-01P insolúvel em KCl 0,1 mol.L⁻¹ e a fração K-01S solúvel.

6.4 HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL

As análises de composição monossacarídica foram realizadas através de hidrólise ácida total com TFA 1 mol.L⁻¹ por 4 h a 100 °C. Para os polissacarídeos permetilados a hidrólise ácida total (Matulewicz *et al.*, 1990) foi conduzida com ácido fórmico 45% a 100 °C por 16 h. As amostras hidrolisadas foram reduzidas com NaBH₄ ou NaBD₄ por 12 h e depois neutralizadas com ácido acético (AcOH) para retirada do excesso de agente redutor. Posteriormente as amostras foram codestiladas três vezes com metanol, para remover o borato de trimetila, composto volátil derivado do ácido bórico produzido na etapa de redução. Após liofilização, os alditóis foram acetilados com 0,2 mL da mistura de anidrido acético e piridina (1:1 v/v) por 12 h a temperatura ambiente. As amostras na forma de alditol acetato foram submetidas a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM).

6.5 CARBOXIRREDUÇÃO

Porções da fração polissacarídica F foram submetidas ao processo de carboxirredução dos monossacarídeos ácidos de acordo com o método de Taylor e Conrad (1972), utilizando-se NaBH_4 ou NaBD_4 . As porções de F foram solubilizadas em tampão MES $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 4,75) e na sequência foi adicionada carbodiimida [1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)-carbodiimida] (CMC) na proporção de $1,0 \text{ mmol}$ de carbodiimida : 100 meq. de carboxila, sendo as amostras mantidas sob agitação por 1 hora. Após ajuste do pH para 7,0 pela adição de tampão TRIS 2 mol.L^{-1} , foi adicionado NaBH_4 ou NaBD_4 até a obtenção de uma solução 2 mol.L^{-1} . Após 12 h a 30°C e neutralização com HCl, as frações FR e FR*, respectivamente reduzidas com NaBH_4 e NaBD_4 , foram dialisadas contra água destilada e liofilizadas.

6.6 DESSULFATAÇÃO POR TRATAMENTO SOLVOLÍTICO

6.6.1 Preparo do sal de piridônio

O processo de solvólise foi conduzido com os polissacarídeos nativo F e carboxirreduzido FR na forma de sal de piridônio. Este sal é formado através da solubilização do polissacarídeo em água e adição da resina catiônica Dowex 50 x 8 na forma ácida (H^+), sob agitação magnética a temperatura ambiente por 30 minutos. Os filtrados foram neutralizados com piridina, até pH 7,0 e liofilizado (Nagasawa *et al.*, 1979).

6.6.2 Solvólise

Os polissacarídeos nativo F e carboxirreduzido FR, na forma de sal de piridônio, foram solubilizados em uma mistura de dimetilsulfóxido (DMSO), metanol e piridina, na proporção de 89:10:1 v/v/v, respectivamente, respeitando-se a relação de 10 mg de polissacarídeo para 3 mL de mistura (Nagasawa *et al.*, 1979).

As soluções resultantes foram mantidas a 100°C durante 4 h. Após resfriamento, as amostras solvolisadas foram dialisadas contra água destilada e então liofilizadas. A ulvana nativa F dessulfatada e a carboxirreduzida FR dessulfatada foram identificadas pelas siglas FD e FRD, respectivamente.

6.7 ANÁLISE DE METILAÇÃO

6.7.1 Preparo do sal de trietilamônio

As frações carboxirreduzidas, marcada com deutério FR* e dessulfatada FRD, foram inicialmente reduzidas com NaBH₄, para garantir a redução das extremidades redutoras dos polissacarídeos e evitar degradação dos mesmos durante o processo de metilação, o qual é realizado em meio básico. Após a redução FR* e FRD foram neutralizadas com AcOH e dialisadas até condutividade zero e então dialisadas contra solução de trietilamina 5% (m/v) durante 12 h. Depois de 4 h em diálise contra água destilada com duas trocas da água de diálise, os polissacarídeos foram liofilizados. A diálise contra trietilamina visa obter polissacarídeos na forma de sal de trietilamônio os quais são solúveis no solvente aprótico DMSO utilizado no processo de metilação (Stevenson e Furneaux, 1991).

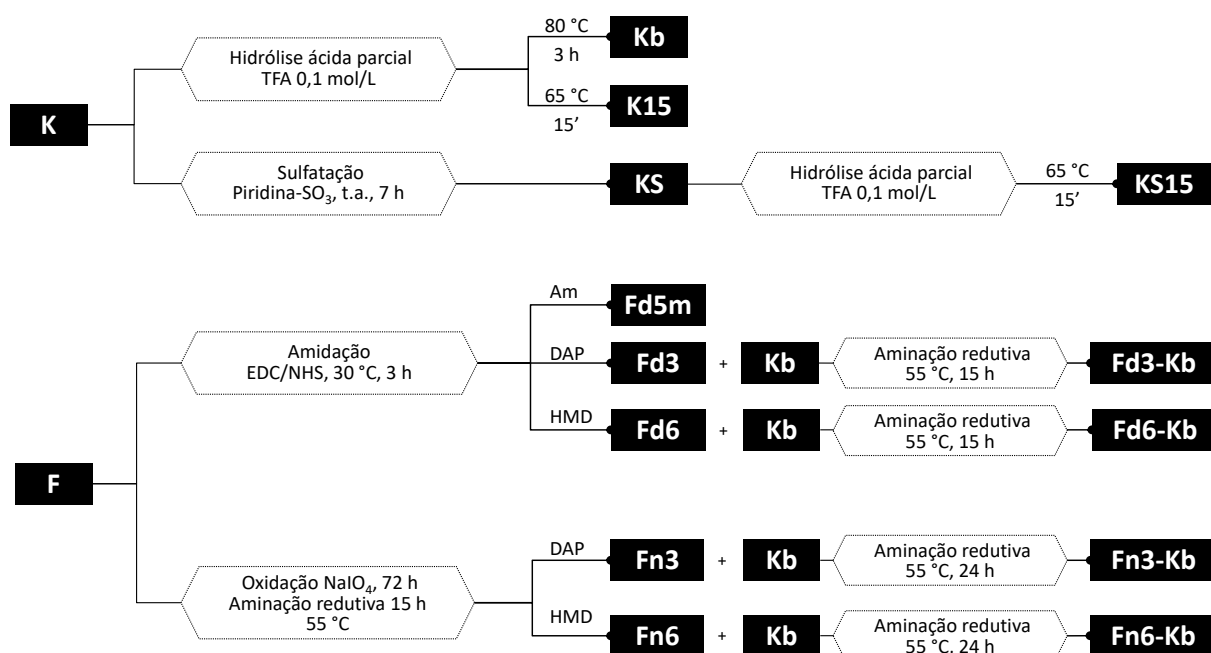
6.7.2 Metilação e derivatização

Os polissacarídeos FR* e FRD na forma de sal de trietilamônio foram submetidos ao procedimento de metilação conforme o método de Ciucanu e Kerek (1984). Após solubilização dos polissacarídeos em DMSO (proporção de 1 mL para 15 mg de polissacarídeo), adicionou-se hidróxido de sódio (NaOH) pulverizado (30 mg) e a mistura permaneceu sob agitação mecânica vigorosa por 30 minutos. Após esse intervalo de tempo, adicionou-se ao meio iodoetano (ICH₃) (proporção de 0,1 mL para 15 mg de polissacarídeo) sob agitação mecânica vigorosa por mais 30 minutos. Este processo (adição de NaOH e iodoetano) foi repetido por mais duas vezes, completando-se assim a primeira etapa de metilação. As frações sofreram duas ou três etapas de metilação, sendo que após cada etapa as frações foram neutralizadas com AcOH, dialisadas contra água destilada e liofilizadas. Os polissacarídeos permetilados foram submetidos à hidrólise ácida total com ácido fórmico 45%, a 100 °C, por 16 h. Após remoção do ácido por codestilação com água (três vezes) os produtos de hidrólise foram reduzidos com NaBD₄ ou NaBH₄ por 12 h e acetilados com anidrido acético:piridina (1:1 v/v) por 12 h a temperatura ambiente. Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados por CG-EM.

6.8 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS

As frações polissacarídicas F e K foram submetidas a diferentes processos de modificação química. Os processos de obtenção de cada fração modificada são descritos a seguir e seguem o esquema geral (FIGURA 9):

FIGURA 9 - ESQUEMA DE OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES MODIFICADAS



Am	<i>n</i> -pentilamina	DAP	1,3-diaminopropano
EDC	<i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N</i> -etilcarbodiimida	F	ulvana de <i>U. fasciata</i>
K	<i>kappa</i> -carragenana de <i>K. alvarezii</i>	HMD	1,6-diaminoexano
NaIO₄	<i>m</i> -periodato de sódio	NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
Piridina-SO₃	complexo piridina-trióxido de enxofre	TFA	ácido trifluoracético

FONTE: O autor (2017).

6.9 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA ULVANA VIA AMIDAÇÃO COM MONOAMINA: OBTENÇÃO DA FRAÇÃO Fd5m

No procedimento de amidação para produção de Fd5m, uma porção da fração polissacarídica F (0,25% m/v) foi solubilizada em tampão MES 0,2 mol.L⁻¹ (pH 4,27) e foi adicionada de *n*-pentilamina (Am, 20 meq.), então o pH foi ajustado para 4,27 com HCl 1 mol.L⁻¹. As porções de cloridrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC; 4 meq.) e *N*-hidroxisuccinimida (NHS; 5 meq.) foram pesadas separadamente e então solubilizadas em água (2,5 mL). Assim a solução aquosa contendo os devidos equivalentes de EDC e NHS foi adicionada à reação. Após ajuste do pH para 4,27 a mistura permaneceu sob agitação por 3 h a 30 °C. Após diálise sequencial contra água destilada, NaCl 1 mol.L⁻¹ e água destilada (MWCO 6-8 KDa) o material retido na diálise foi liofilizado, originando a fração ulvana-amida Fd5m.

Destaca-se que os miliequivalentes (meq.) de amina, EDC e NHS utilizados nas reações de amidação da ulvana F foram calculados em relação a quantidade de carboxilas presentes no polissacarídeo. Assim, tendo em vista que a análise estrutural da ulvana F mostrou 25% (m/m) de ácidos urônicos presentes neste polissacarídeo e considerando-se a relação de 1 meq. de carboxila igual a 198 mg de ácido urônico (valor que corresponde a massa dos monossacarídeos ácidos presentes na ulvana na forma sódica), tem-se que para 100 mg da ulvana F há 25 mg de ácidos urônicos, os quais correspondem a 0,126 meq. de carboxila.

6.10 MODIFICAÇÃO DA ULVANA VIA AMIDAÇÃO COM DIAMINAS: OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES Fd3 E Fd6

Nos procedimentos preparativos de amidação para produção de Fd3 e Fd6, porções da fração polissacarídica F (0,25% m/v) foram solubilizadas, separadamente, em tampão MES 0,2 mol.L⁻¹ (pH 4,27) e foram adicionadas de 1,3-diaminopropano (DAP, 20 meq.) ou 1,6-diaminoexano (HMD, pelo menos 20 meq. em estado líquido a aproximadamente 40 °C), então o pH foi ajustado para 4,27 com HCl 2 mol.L⁻¹. Os equivalentes foram calculados assim como descrito no item 6.9. As porções de cloridrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC; 4 meq.) e *N*-hidroxisuccinimida (NHS; 5 meq.) foram pesadas separadamente e então solubilizadas em água. Assim as soluções aquosas contendo os devidos equivalentes

de EDC e NHS foram adicionadas às reações de amidação com cada uma das diaminas. Após ajuste do pH para 4,27 as reações permaneceram em agitação por 3 h a 30 °C. Após diálise sequencial contra água destilada, NaCl 1 mol.L⁻¹ e água destilada (MWCO 6-8 KDa) os meios reacionais foram liofilizados, originando as frações de ulvana modificadas: Fd3 para ulvana-amida obtida por meio da ligação covalente entre as carboxilas da ulvana e a diamina 1,3-diaminopropano e Fd6 para ulvana-amida obtida a partir da ligação covalente entre as carboxilas dos ácidos urônicos com a diamina 1,6-diaminoexano.

6.11 MODIFICAÇÃO DA ULVANA VIA OXIDAÇÃO SEGUIDA DE AMINAÇÃO REDUTIVA: OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES Fn3 E Fn6

Nos procedimentos preparativos de oxidação-aminação redutiva sequencial para produção de Fn3 e Fn6, porções da fração polissacarídica F (0,25% m/v) foram solubilizadas com auxílio de temperatura (~30 °C), separadamente, em solução aquosa de n-propanol 20% (v/v). As soluções polissacarídicas foram acondicionadas em balões de fundo redondo isolados da luz ambiente, foi adicionado *m*-periodato de sódio (NaIO₄, concentração final 18,7 mmol.L⁻¹) e mantidas sob agitação a temperatura de 55 °C por 72 h (pH inicial de oxidação igual a 5). A reação de oxidação foi interrompida com a adição de etilenoglicol (concentração final 36,4 mmol.L⁻¹) e agitação por mais 30 min (pH final de oxidação igual a 5). Parte dos meios reacionais (5 mL) de cada balão foram aliquoteados para comparação de ambos os processos de oxidação da ulvana, tendo sido dialisados (MWCO 6-8 KDa) sequencialmente contra água destilada, NaCl 1 mol.L⁻¹ e água destilada e liofilizados. Estas frações foram denominadas Fa3 e Fa6, referentes às formas aldeídicas da ulvana para ambas as reações de oxidação realizadas em condições idênticas. Ao restante de cada um dos meios reacionais foram adicionadas 1,3-diaminopropano (DAP, concentração final 236,6 mmol.L⁻¹) ou 1,6-diaminoexano (HMD, em estado líquido a aproximadamente 40 °C, concentração final 261,2 mmol.L⁻¹). O pH resultante após a adição das diaminas foi igual a 12 para ambos os meios reacionais, os quais tiveram o pH ajustado para 5,0 primeiramente com HCl concentrado e depois com HCl 2 mol.L⁻¹. Os meios reacionais, cada um contendo a ulvana oxidada em presença de uma das diaminas, permaneceram em pH 5, à 55 °C sob agitação, durante 5 h e então cada meio foi adicionado de AcOH (concentração final 4 mmol.L⁻¹) e NaBH₃CN

(concentração final 14 mmol.L^{-1}), sendo o pH de cada meio ajustado para pH igual a 5. Os meios reacionais, em presença de AcOH, agente redutor e diaminas, permaneceram à 55°C sob agitação, durante 15 h. Ao final dos processos de aminação redutiva os valores de pH dos meios reacionais foram iguais a 6,0 e 5,5, para as reações de produção de Fn3 e Fn6, respectivamente. Os meios reacionais foram evaporados em evaporador rotativo ($\sim 50^\circ\text{C}$) e então dialisados sequencialmente contra água destilada, NaCl 1 mol.L^{-1} e água destilada, e então liofilizados, originando as frações de ulvana funcionalizadas: Fn3 para ulvana-amina obtida a partir da ligação covalente entre as os grupos aldeído formados pela oxidação com *m*-periodato e a diamina 1,3-diaminopropano e Fn6 para ulvana-amina obtida a partir da ligação covalente entre as os grupos aldeído e a diamina 1,6-diaminoexano.

6.12 SULFATAÇÃO QUÍMICA DA K-CARRAGENANA: OBTENÇÃO DA FRAÇÃO QUIMICAMENTE SULFATADA KS

A fração K (6 g) foi reduzida com NaBH_4 (625 mg) por 12 h sob agitação a temperatura ambiente, neutralizada com AcOH sob agitação até pH 7,0, dialisada sequencialmente contra água destilada, NaCl 1 mol.L^{-1} , água destilada e trietilamina 3% (m/v) (MWCO 6-8 KDa) e liofilizada (Araújo *et al.*, 2013). A fração K (6,7 g) na forma de sal de trietilamônio foi solúvel no meio reacional de sulfatação química. Assim, após sua solubilização em DMFa (0,56% m/v) foram adicionados ao meio reacional: 2-metil-2-butenol (10% v/v) e, aos poucos, complexo de piridina- SO_3 (5% m/v). O meio reacional de sulfatação, com pH inicial igual a 4, foi mantido sob agitação por 7 h a temperatura ambiente. A reação foi interrompida com NaHCO_3 (até pH 5) e então o polissacarídeo precipitado com etanol 3 volumes, centrifugado e ressolubilizado em tampão fosfato $0,025 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 7,0). Após diálise sequencial contra água destilada, NaCl 1 mol.L^{-1} e água destilada (MWCO 6-8 KDa) o polissacarídeo foi liofilizado, originando a fração de *kappa*-carragenana quimicamente sulfatada (KS).

6.13 HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DAS K-CARRAGENANAS NATIVA (K) E QUIMICAMENTE SULFATADA (KS): OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES Kb, K15 E KS15

As frações polissacarídicas de *kappa*-carragenana nativa (K) e quimicamente sulfatada (KS) foram submetidas a processos de hidrólise ácida parcial para obtenção de despolimerizados (modificado de Ducatti *et al.*, 2011). As frações K e KS foram solubilizadas em água (80-90 °C) e adicionadas de TFA 1 mol.L⁻¹ (concentração final 0,1 mol.L⁻¹) e permaneceram por 15 minutos a 65 °C. Aos meios reacionais foi adicionada água (proporção 1:1) e então foram evaporados em evaporador rotativo, com água, em temperatura de até 50 °C, por três vezes. Após ressolubilizados em água e dialisados sequencialmente contra água destilada, NaCl 1 mol.L⁻¹ e água destilada (MWCO 1 KDa) os despolimerizados obtidos de K e KS foram liofilizados, originando as frações K15 e KS15, respectivamente.

Outra porção da fração K foi submetida ao processo de hidrólise ácida parcial para obtenção de dissacarídeos de *kappa*-carragenana (κ -carrabiose) (Stevenson e Furneaux, 1991). A fração K foi solubilizada em água (80-90 °C) e adicionada de TFA 1 mol.L⁻¹ (concentração final 0,1 mol.L⁻¹) e permaneceu por 3 h a 80 °C, então foi adicionada de água e evaporada em evaporador rotativo com água (3x), codestilada com tolueno (3x) e então ressolubilizada em água e liofilizada, originando a fração dissacarídica Kb.

6.14 SEMISSÍNTESE DE POLISSACARÍDEOS HÍBRIDOS SULFATADOS VIA AMINAÇÃO REDUTIVA

As ulvanas, tendo sido funcionalizadas nas formas amida (Fd3 e Fd6) e amina (Fn3 e Fn6), apresentaram em suas estruturas grupos amino livres capazes de ligarem-se covalentemente aos oligossacarídeos redutores da fração Kb através de reações do tipo aminação reductiva.

6.14.1 Semissíntese de polissacarídeos híbridos a partir de ulvanas-amida: obtenção dos polissacarídeos híbridos sulfatados Fd3-Kb e Fd6-Kb

Porções de cada uma das ulvanas Fd3 e Fd6 foram solubilizadas (0,714% m/v) separadamente, em água, em balões de fundo redondo. A cada balão

foi adicionada a fração de *kappa*-oligossacarídeo redutor Kb (8 meq.). Após solubilização dos *kappa*-oligossacarídeos as misturas reacionais tiveram o pH ajustado para 5,0 com NaOH 8 mol.L⁻¹ e permaneceram sob agitação por 7 h em temperatura ambiente. Então a cada mistura reacional foram adicionados AcOH (1,5 meq.) e NaBH₃CN (5 meq.) e após ajuste do pH para 5 com NaOH 8 mol.L⁻¹, os meios reacionais foram mantidos sob agitação a 55 °C por 15 h. O pH final das reações ficou em torno de 6. As misturas reacionais foram dialisadas, contra água destilada, NaCl 1 mol.L⁻¹ e água destilada subsequentemente, em membranas de 6-8 KDa. Os polissacarídeos híbridos sulfatados foram então liofilizados, originando as frações Fd3-Kb e Fd6-Kb.

Os miliequivalentes (meq.) de Kb, AcOH e NaBH₃CN utilizados nas reações de aminação redutiva das ulvanas-amida Fd3 e Fd6 foram calculados, assim como no item 6.9, em relação a quantidade de carboxilas presentes no polissacarídeo nativo F, supondo-se que todas as carboxilas sofreram amidação.

6.14.2 Semissíntese de polissacarídeos híbridos a partir de ulvanas-amina: obtenção dos polissacarídeos híbridos sulfatados Fn3-Kb e Fn6-Kb

Porções de cada uma das ulvanas Fn3 e Fn6 foram solubilizadas (0,714% m/v) separadamente, em água, em balões de fundo redondo. A cada balão foi adicionada a fração de *kappa*-oligossacarídeo redutor Kb (concentração final 32,6 mmol.L⁻¹). Após solubilização dos *kappa*-oligossacarídeos as misturas reacionais tiveram o pH ajustado para 5,0 com NaOH 8 mol.L⁻¹ e permaneceram sob agitação por 7 h em temperatura ambiente. A cada mistura reacional foram adicionados AcOH (concentração final igual a 12,5 mmol.L⁻¹) e NaBH₃CN (concentração final igual a 43 mmol.L⁻¹) e após ajuste do pH para 5 com NaOH 8 mol.L⁻¹ os meios reacionais foram mantidos sob agitação a 55 °C por 24 h. As misturas reacionais foram dialisadas, contra água destilada, NaCl 1 mol.L⁻¹ e água destilada, subsequentemente, em membranas de 12-14 KDa. Os polissacarídeos híbridos sulfatados foram então liofilizados, originando as frações Fn3-Kb e Fn6-Kb.

6.15 MÉTODOS ANALÍTICOS

6.15.1 Dosagem de carboidratos totais

A dosagem de carboidratos totais foi realizada pelo método colorimétrico do fenol - ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), que possui intervalos lineares entre 10-40 µg para L-ramnose, 25-115 µg para ácido D-glucurônico, 5-75 µg para D-xilose e 10-85 µg para D-galactose. As amostras foram preparadas em triplicata e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 485nm para ulvanas e 490 nm para galactanas. As curvas-padrão foram realizadas a cada dosagem utilizando-se como padrão, para ulvanas, uma mistura de L-ramnose, ácido D-glucurônico e D-xilose numa razão de 5:3:2, em concentrações equivalentes a 10, 20, 30, 35 e 40 µg de carboidratos. Para as amostras de galactana foram realizadas curvas-padrão com D-galactose em concentrações equivalentes a 10, 30, 50, 70 e 80 µg de carboidratos. As amostras foram diluídas em soluções aquosas (1 mg.mL⁻¹), sendo utilizados 50 µL desta solução para a dosagem.

6.15.2 Dosagem de proteínas totais

As dosagens de proteínas totais foram realizadas por método colorimétrico (Lowry *et al.*, 1951) com intervalo linear entre 5-100 µg de proteína. As amostras foram preparadas em triplicata e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 660nm. As curvas-padrão foram preparadas a cada dosagem utilizando-se como padrão soro-albumina bovina cristalina em concentrações equivalentes a 10, 20, 40, 60 e 70 µg de proteína. As amostras foram diluídas em água na concentração de 1 mg.mL⁻¹, sendo utilizados 500 µL da solução de amostra na dosagem.

6.15.3 Dosagem de ácidos urônicos

A determinação do teor de ácidos urônicos foi realizada pelo método da *m*-hidroxibifenila (Filisetti-Cozzi e Carpita, 1991). Este método apresenta intervalo de quantificação de 1-38 µg de ácidos urônicos. As amostras foram preparadas em triplicata e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 525 nm. As curvas-padrão foram preparadas a cada dosagem utilizando-se

como padrão ácido D-glucurônico em concentrações equivalentes a 2, 5, 10, 20 e 30 µg de ácido urônico. As amostras foram diluídas em água na concentração de 1 mg.mL⁻¹, sendo utilizados 100 µL da solução de amostra na dosagem.

6.15.4 Dosagem de grupos O-sulfato

A determinação do teor de grupos O-sulfato foi realizada pelo método de Dodgson e Price (1962), após hidrólise das amostras com HCl 1 mol.L⁻¹ durante 5 h a 105-110 °C. Às amostras adiciona-se o reativo gelatina-bário, no qual o cloreto de bário está solúvel e ao entrar em contato com o sulfato da amostra forma o sal insolúvel sulfato de bário, que fica suspenso no fluido gelatinoso, resultando na turbidez do meio reacional. O padrão utilizado consiste em uma solução de sulfato de sódio diluída em HCl 1 mol.L⁻¹, na concentração 1 mg.mL⁻¹. As amostras foram organizadas em triplicata e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 360 nm. A linearidade do método é de 20-200 µg de sulfato. As curvas-padrão foram preparadas a cada dosagem utilizando-se o padrão em concentrações equivalentes a 30, 60, 90, 150 e 190 µg de sulfato de sódio. A massa das amostras variou entre 2 a 4 mg antes da solubilização em HCl 1 mol.L⁻¹ para hidrólise. Os valores das massas pesadas foram anotados para correção da porcentagem de sulfato após a dosagem.

O grau de substituição dos polissacarídeos repetitivos de *kappa*-carragenana foi calculado utilizando a seguinte fórmula (Whistler e Spencer, 1964):

$$DS = \frac{306,27 \times S}{3200 - (102 \times S)}$$

Onde: 306,27 = 1 mol da unidade repetitiva (G-DA)
 3200 = massa atômica do enxofre (32 g) x 100
 102 = representa 1 mol do éster substituinte (SO₃Na)
 S = representa o teor de enxofre dado em porcentagem

6.15.5 Determinação da rotação óptica específica

A análise da rotação óptica específica ([α]^D) foi realizada em polarímetro JASCO P-2000, modelo PTC203, comprimento de onda de 589 nm, a 20°C, com as

amostras na concentração de 0,2% (m/v) em água. A rotação óptica específica foi calculada pelo Software Jasco P-2000 a partir de três leituras de rotação óptica.

6.15.6 Determinação dos teores de nitrogênio

Os teores de nitrogênio dos polissacarídeos nativos e híbridos foram determinados pela técnica de análise elementar utilizando-se entre 10 a 20 mg das amostras polissacarídicas liofilizadas. Os resultados foram expressos em g% (m/m) (g de nitrogênio / 100 g de amostra).

A determinação de nitrogênio foi realizada por combustão em analisador CHNOS, marca ELEMENTAR, modelo VARIO EL III. As análises foram realizadas no Laboratório de Biogeoquímica e Nutrição de Plantas, do Departamento de Solos e Engenharia Agrícola, Setor de Ciências Agrárias (UFPR).

6.16 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

6.16.1 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM)

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas foram realizadas em cromatógrafo a gás da marca Varian (Palo Alto, USA), modelos Saturn 2000R e 4000. A análise cromatográfica foi realizada em coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 μ m) DB-225MS (Durabond) utilizando-se gás hélio como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL.minuto⁻¹. A temperatura do injetor foi de 250 °C e a temperatura inicial do forno foi de 50 °C, seguido de aumento gradual de 40 °C por minuto, até 230 °C para alditol acetato e 210 °C para alditol acetato parcialmente metilado, mantendo-se constante a partir de 25 e 30 minutos, respectivamente. A detecção por massas foi realizada com analisador do tipo Ion Trap, sendo os espectros de massas obtidos por impacto de elétrons a 70 eV, com *m/z* (relação massa/carga) de 80 a 220.

Os cromatogramas foram analisados e integrados em software Saturn Workstation 5.1. Esse método foi utilizado para quantificação relativa de acetatos de alditóis e acetatos de alditóis permetilados, sendo os mesmos identificados por meio de seus tempos de retenção e perfis característicos de fragmentação por impacto de elétrons (Fox *et al.*, 1990; Carpita e Shea, 1990) e comparados com padrões produzidos por Sasaki *et al.* (2005).

6.16.2 Cromatografia de exclusão por tamanho de alta performance (HPSEC) acoplada a detector de espalhamento de luz laser em multiângulos (MALLS) e índice de refração (RI) diferencial

O perfil cromatográfico das amostras foi determinado em cromatógrafo de exclusão por tamanho de alta performance (HPSEC) WATERS, equipado com um detector de índice de refração (RI) diferencial WATERS modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz laser em multiângulos (MALLS) WAYTT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP, com 18 detectores dispostos ao redor da fotocélula em diferentes ângulos. Foram utilizadas quatro colunas WATERS, conectadas em série, limites de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 g.mol⁻¹ (Colunas Ultrahydrogel™ 2000, 500, 250 e 120, respectivamente), e solução de nitrito de sódio (NaNO₂ 0,1 mol.L⁻¹) contendo azida de sódio (NaN₃ 200 ppm) como eluente a 20 °C.

Para as análises de homogeneidade foram preparadas soluções de 1 mg de amostra em 1 mL de nitrito de sódio (NaNO₂ 0,1 mol.L⁻¹) e azida de sódio (NaN₃ 200 ppm) dissolvidas em água ultrapura. As amostras foram filtradas em membrana de acetato de celulose de 0,22 µm.

As massas molares ponderais médias relativas dos compostos estudados no presente trabalho foram estimadas por meio de curvas padrão com dextranas (Sigma-Aldrich), óxidos de polietileno (Waters) e padrões de galactanas sulfatadas (Colodi, 2011). Os padrões de dextrana (M_w entre $9,4 \times 10^3$ e 487×10^3 g.mol⁻¹), de óxido de polietileno (M_w entre $24,8 \times 10^3$ e 599×10^3 g.mol⁻¹) e galactanas sulfatadas (M_w entre $51,6 \times 10^3$ e 114×10^3 g.mol⁻¹) foram solubilizados na solução eluente de nitrito de sódio (NaNO₂ 0,1 mol.L⁻¹) e azida de sódio (NaN₃ 200 ppm). As soluções padrão foram filtradas em membrana de acetato de celulose de 0,22 µm e injetadas no sistema cromatográfico HPSEC-MALLS-RI. Os cromatogramas foram coletados e analisados no software ASTRA versão 4.5.0.

As curvas padrão de dextranas, óxidos de polietileno e galactanas sulfatadas apresentam os valores de massas molares ponderais médias em escala logarítmica em função dos tempos de retenção. A TABELA 2 mostra os tempos de retenção (min) e as massas molares ponderais médias dos padrões, bem como os coeficientes de determinação e resultados de regressão linear, utilizados para estimar as massas molares ponderais médias relativas das moléculas de interesse.

TABELA 2 - TEMPOS DE RETENÇÃO, MASSAS MOLARES PONDERAIS MÉDIAS (M_w) E EQUAÇÕES OBTIDAS POR REGRESSÃO LINEAR

Produto	M_w ($\times 10^3$ g.mol ⁻¹) ^a	Log M_w	Tr. (min) ^b	Equações ^c
Dextrana				
D-5251	487	5,69	44,67	
D-7265	266	5,42	45,17	
D-4751	77,8	4,89	48,83	$y = -0,1741 + 13,367$
D-4133	40,2	4,60	49,92	$R^2 = 0,988$
D-9260	9,4	3,97	54,17	
Óxido de polietileno				
WAT011584	599	5,78	41,54	
WAT011580	177	5,25	43,84	$y = -0,1622 + 12,451$
WAT011576	41,3	4,62	48,34	$R^2 = 0,989$
WAT011574	24,8	4,39	49,79	
Galactanas sulfatadas ^d				
DSi-1	51,6	4,71	58,1	
DSi-2e	60,11	4,78	56,0	$y = -0,0301x + 6,4597$
DSi-3	63,77	4,80	55,0	$R^2 = 0,970$
DSi-4	86,82	4,94	49,3	
DSi-5	114,0	5,06	47,6	

^a Massas molares especificadas pelo fabricante; ^b Tempos de retenção (min); ^c As equações obtidas por regressão linear expressam $y = \log M_w$ e $x =$ tempo de retenção (min) e os coeficientes de determinação (R^2); ^d Colodi, 2011. Fonte: O autor (2017).

6.17 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Diferentes técnicas foram empregadas no estudo das amostras por meio de ressonância magnética nuclear (RMN): RMN de ^1H e de ^{13}C , COSY (*Correlation Spectroscopy*), HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy*), HSQC-editado e HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*).

Todas estas técnicas de RMN foram realizadas no Centro de RMN da UFPR equipado com os seguintes espectrômetros: Bruker AVANCE III 600 de campo magnético de 14,095 Tesla (600 MHz); Bruker AVANCE 400 de 9,4 Tesla (400 MHz); Bruker DRX 400 de 9,4 Tesla (400 MHz) e Bruker DPX 200 de 4,7 Tesla (200 MHz).

As análises de ressonância magnética nuclear mono e bidimensionais foram realizadas nos espectrômetros de 400 ou 600 MHz, série Avance, em tubos de 5 mm de diâmetro, sendo as amostras dissolvidas em água deuterada 99% (D_2O). Os deslocamentos químicos, expressos em ppm, foram determinados com auxílio dos

deslocamentos químicos da acetona, para facilitar a interpretação dos dados da literatura, a qual utiliza acetona como padrão interno, tanto para as análises de ^{13}C (30,20 ou 31,45 ppm) como para ^1H (2,224 ou 2,225 ppm).

6.17.1 Ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN de ^{13}C)

Os espectros desacoplados de RMN de ^{13}C foram obtidos na frequência base de 100,61 MHz, com intervalo de aquisição de sinal de 0,6 segundos, fazendo-se, em média, 66.400 aquisições, utilizando-se um intervalo de 0,1 segundo entre os pulsos. As amostras foram dissolvidas em D_2O , em concentração de $\sim 30 \text{ mg.mL}^{-1}$.

6.17.2 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H)

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos na frequência base de 400,13 MHz. As amostras foram dissolvidas em D_2O , em concentração de $\sim 10 \text{ mg.mL}^{-1}$.

6.17.3 COSY (COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$)

Esta é uma técnica bidimensional homonuclear utilizada para correlacionar os deslocamentos químicos dos núcleos de ^1H que estão acoplados um com o outro. Assim, nos carboidratos o H1 de um monossacarídeo apresenta acoplamento com o H2 da mesma unidade, sendo possível observar esta interação na forma de um pico cruzado (*cross peak*) entre os mesmos sinais, quantificar esta interação através da determinação da constante de acoplamento (3J) e ainda determinar o deslocamento químico do H2 a partir do H1. Desta forma a partir do sinal de H2 pode ser determinado o H3 e assim sucessivamente ao longo do anel. Como cada unidade monossacarídica apresenta um padrão de constantes de acoplamento característico, com estes resultados é possível determinar o tipo de monossacarídeo presente na estrutura.

Os espectros foram obtidos na frequência base de 400,13 MHz. As amostras foram dissolvidas em D_2O , em concentração de $\sim 10 \text{ mg.mL}^{-1}$.

6.17.4 HSQC (HSQC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$)

Esta técnica bidimensional heteronuclear, permite determinar quais átomos de hidrogênio (^1H) estão ligados aos respectivos átomos de carbono (^{13}C) a partir de sinais de ^{13}C conhecidos ou de ^1H já determinados por COSY ou pela literatura. As

amostras para os experimentos bidimensionais seguem o mesmo protocolo do preparo para RMN de ^1H .

6.17.5 HSQC-editado

A sequência do HSQC editado fornece informações de multiplicidade semelhantes às de uma sequência de RMN de ^{13}C DEPT-135 (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*). Assim, as correlações dos grupos CH_2 aparecem em fase negativa em relação à linha de base.

As amostras foram dissolvidas em D_2O , em concentração de $\sim 10 \text{ mg.mL}^{-1}$.

6.17.6 HMBC

Nesta técnica bidimensional heteronuclear, uma segunda dimensão de frequência é aplicada para suprimir sinais. As correlações referentes aos núcleos de uma ligação química de distância são eliminadas e o espectro mostra correlações entre hidrogênios e núcleos de carbono que estão distantes por duas ou mais ligações. Correlações de quatro ligações podem ser encontradas em sistemas conjugados.

Experimentos de HMBC ocorrem com detecção de hidrogênios, permitindo a obtenção indireta de correlações carbono-carbono (embora não as correlações ^{13}C – ^{13}C) e as correlações entre carbonos tetrassubstituídos e hidrogênios próximos. No entanto, algumas correlações de duas ligações ou três ligações de distância podem estar ausentes, dependendo da hibridização do carbono e de outros fatores. Adicionalmente, as correlações podem sofrer variações em função de variações na magnitude das constantes de acoplamento (Silverstein *et al.*, 2007).

6.18 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA DE CÉLULAS DE LINHAGENS NORMAL E TUMORAL NA PRESENÇA DAS MOLÉCULAS MODIFICADAS

A avaliação da citotoxicidade dos polissacarídeos modificados foi realizada em colaboração com o grupo de pesquisa representado pela Profa. Dra. Sheila Maria Brochado Winnischofer, Laboratório de Oxidações Biológicas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná.

6.18.1 Cultivo de células: linhagens, manutenção e preservação das culturas

Os ensaios de atividade metabólica celular *in vitro* utilizando os polissacarídeos nativos e modificados foram realizados em linhagem de fibroblasto humano normal MRC-5 e linhagem de melanoma metastático humano WM9.

A linhagem de fibroblasto normal MRC-5 (Jacobs *et al.*, 1970) foi cedida pela Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar, do Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL/NETCEM) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (São Paulo, SP, Brasil) e tem sido mantida pelo grupo de pesquisa da Profa. Sheila Maria Brochado Winnischofer.

O cultivo da linhagem de fibroblasto normal MRC-5 foi realizado em meio DMEM/alta glucose (Sigma-Aldrich). O meio DMEM/alta glucose (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contém aproximadamente quatro vezes mais vitaminas e aminoácidos que o Meio Basal de Eagle, além de ser enriquecido com glucose (4500 mg.L^{-1}). O meio foi reconstituído em água ultrapura na concentração de $13,4 \text{ g.L}^{-1}$, suplementado com $3,7 \text{ g.L}^{-1}$ de NaHCO_3 (Sigma) e 10% (v/v) de soro fetal bovino (Gibco).

A linhagem de melanoma metastático humano WM9 (Hsu *et al.*, 2002) foi cedida pelo Professor Meenhard Herlyn, do Wistar Institute (Philadelphia, PA, EUA), e enviadas ao grupo de pesquisa da Profa. Sheila Maria Brochado Winnischofer pela Profa. Dra. Enilza Espreafico, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Ribeirão Preto, SP, Brasil).

O cultivo da linhagem de melanoma metastático humano WM9 foi realizado em meio Tu, composto por três partes de meio MCDB 153 (Boyce e Ham, 1983) para uma parte de meio Leibowitz-15 (L-15) (Leibowitz, 1963), sendo estes componentes obtidos da Sigma (St. Louis, Illinois, Estados Unidos). O meio foi suplementado com 2% (v/v) de soro fetal bovino (Gibco), $5 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ de insulina humana recombinante (Sigma-Aldrich), 2 mmol.L^{-1} de CaCl_2 (Merck, Darmstadt, Alemanha), 100 U.mL^{-1} de penicilina e $50 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ de estreptomicina (Sigma).

As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera com 5% CO_2 . A manipulação das células, ambas aderentes, foi realizada utilizando solução 0,1% de tripsina para desprender as células. Subculturas foram realizadas quando as culturas apresentavam aproximadamente 80% de confluência. Os estoques das linhagens foram feitos adicionando DMSO às suspensões celulares até uma concentração de 5

e 10% (v/v), para MRC-5 e WM9, respectivamente. As suspensões de células foram aliquotadas em tubos criogênicos e mantidas em freezer -80 °C.

6.18.2 Preparo das frações polissacarídicas para os ensaios biológicos

Soluções estoque de 5 mg.mL⁻¹ de polissacarídeo em solução tampão fosfato (pH 7,0) foram previamente filtradas em filtro estéril com limite de exclusão de 0,22 µm, em fluxo laminar e armazenadas em freezer -20 °C. A partir das soluções estoque as amostras foram diluídas nas concentrações de 25, 100 e 500 µg.mL⁻¹ em meio DMEM ou Tu para serem testadas nas células normais MRC-5 ou tumorais WM9, respectivamente.

6.18.3 Determinação da atividade metabólica *in vitro* das células de fibroblasto normal humano MRC-5 e melanoma metastático humano WM9

A atividade metabólica das células foi determinada através do método colorimétrico do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), segundo Mosmann (1983) com algumas modificações. Na presença da enzima mitocondrial succinato desidrogenase, das células de metabolismo normal, o reagente de MTT (amarelo) é reduzido e forma a formazana (violeta), solúvel em DMSO. A intensidade da cor violeta indica a atividade metabólica, proporcional às células ativas.

As células MRC-5 ou WM9 foram contadas e plaqueadas (4x10³ células/poço) em placas de 96 poços com volume final de 200 µL/poço. Em seguida, as placas foram mantidas em estufa a 37 °C, 5% CO₂ por 24 h, para promover a adesão celular. O meio de cultura foi removido e os polissacarídeos em diferentes concentrações foram adicionados, e as placas incubadas por 72 h em estufa a 37 °C, 5% CO₂. Após incubação, 20 µL da solução de MTT em HBSS (5 mg.mL⁻¹) foram adicionados. As placas foram novamente incubadas por 3 h em estufa. Após esse período o MTT não reagente foi retirado e 200 µL de DMSO foram adicionados para dissolver os sais de formazana formados. A absorbância foi medida em leitor de microplacas (TECAN INFINITE M200), em 545 nm, utilizando o DMSO como branco. A condição controle, representada como 100% de atividade metabólica, foi correspondente às células mantidas somente com meio de cultura.

Os ensaios de atividade metabólica pelo método de MTT foram realizados, para cada linhagem celular, em três experimentos independentes e em triplicata para

cada concentração de amostra. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e submetidos à análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey foi realizado para comparação entre as médias, sendo considerados estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de $p < 0,05$.

6.19 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTICOAGULANTE *IN VITRO*

Os ensaios anticoagulantes *in vitro* foram realizados em coagulômetro KL340, quatro canais (Cornley) utilizando *pools* de plasma ovino normais (amostras de plasma cedidas pelo Centro de Desenvolvimento de Testes e Ensaios Farmacêuticos/CTEFAR, Universidade Federal de Santa Maria).

6.19.1 Tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT)

O tempo máximo de ensaio foi de 300 segundos. Os tempos de tromboplastina parcialmente ativada (aPTT) foram determinados com concentrações de 10, 20, 50, 80, 100 e 150 μg de composto/mL de plasma. Como controle negativo (valores normais de coagulação) foi utilizada solução de salina e como controle positivo heparina (192,0 UI. mg^{-1}) na concentração de 10 ou 20 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de plasma. Para a determinação do aPTT (kit HemosIL® - Instrumentation Laboratory Company) foram incubados 100 μL de plasma com 100 μL de salina, amostra, ou heparina a 37 °C por 1 minuto, seguidos por adição de 100 μL de cefalina de coelho e reincubação por 2 minutos. Decorrido este tempo, foram adicionados 100 μL de CaCl_2 0,025 mol. L^{-1} e o tempo de coagulação em segundos foi determinado em triplicata ou quadruplicata para cada concentração.

6.19.2 Tempo de protrombina (PT)

O tempo máximo de ensaio foi de 100 segundos. Os tempos de protrombina (PT) foram determinados com concentrações de 10, 50, 100 e 150 μg de composto/mL de plasma. Como controle negativo (valores normais de coagulação) foi utilizada solução de salina e como controle positivo heparina (192,0 UI. mg^{-1}) na concentração de 10 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de plasma. Para a determinação do PT (kit Soluplastin, Wiener Lab. - Labinbraz Comercial Ltda.) foram incubados 100 μL de plasma com 100 μL de salina, amostra, ou heparina a 37 °C por 2 minutos. Decorrido este tempo, foram adicionados

100 μL do reagente de PT (tromboplastina de coelho, CaCl_2 0,0125 mol.L^{-1} e NaCl 0,1 mol.L^{-1}) e o tempo de coagulação em segundos foi determinado em triplicata ou quadruplicata para cada concentração.

6.19.3 Tempo de trombina (TT)

O tempo máximo de ensaio foi de 100 segundos. Os tempos de trombina (TT) foram determinados com concentrações de 10, 50, 100 e 150 μg de composto/mL de plasma. Como controle negativo (valores normais de coagulação) foi utilizada solução de salina e como controle positivo heparina (192,0 UI.mg^{-1}) nas concentrações de 10 e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de plasma. Para a determinação do TT (kit HemosIL® - Instrumentation Laboratory Company) foram incubados 100 μL de plasma com 100 μL de salina, amostra, ou heparina a 37 °C por 2 minutos. Decorrido este tempo, foram adicionados 100 μL do reagente de TT dissolvido em tampão (trombina bovina) e o tempo de coagulação em segundos foi determinado em triplicata ou quadruplicata para cada concentração.

6.19.4 Tratamento e análise dos dados

Os tempos de coagulação, medidos em segundos, obtidos para cada concentração de amostra, em cada tipo de ensaio, foram expressos como média \pm desvio padrão e comparados aos tempos de coagulação dos controles negativo (salina) e positivo (heparina).

Adicionalmente, para cada tipo de ensaio, os tempos de coagulação foram plotados em função das concentrações analisadas, permitindo determinar através de regressão linear, para cada molécula testada, a concentração necessária para triplicar o valor do tempo de coagulação da salina. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 OBTENÇÃO E ANÁLISE DOS POLISSACARÍDEOS DA ALGA VERMELHA

Kappaphycus alvarezii

A *kappa*-carragenana de *K. alvarezii* permitiu obter *kappa*-carrabiose para a semissíntese de polissacarídeos híbridos sulfatados a partir de ligações covalentes entre estes e os derivados ulvana-amida e ulvana-amina. Adicionalmente, os polissacarídeos isolados de *K. alvarezii* constituíram fonte de moléculas sulfatadas e redutoras com diferentes massas molares a serem testadas em relação as suas atividades anticoagulantes.

7.1.1 Extração e obtenção dos polissacarídeos de *K. alvarezii*

Encontradas somente em galactanas de algas vermelhas, as unidades de 3,6-anidrogallactopirranose são formadas pela atividade da enzima sulfohidrolase a partir de unidades precursoras como α -galactose 6-sulfato e α -galactose 2,6-dissulfato (Usov, 1984). No entanto, a ciclização das unidades precursoras também pode ocorrer em condições alcalinas e presença de temperatura. Assim, a partir da década de 50, a indústria do ágar passou a utilizar o tratamento alcalino para aumentar o rendimento de unidades 3,6-anidrogallactosídicas e melhorar a força dos géis produzidos (Ciancia *et al.*, 1993; McHugh, 2003; Zibetti *et al.*, 2005).

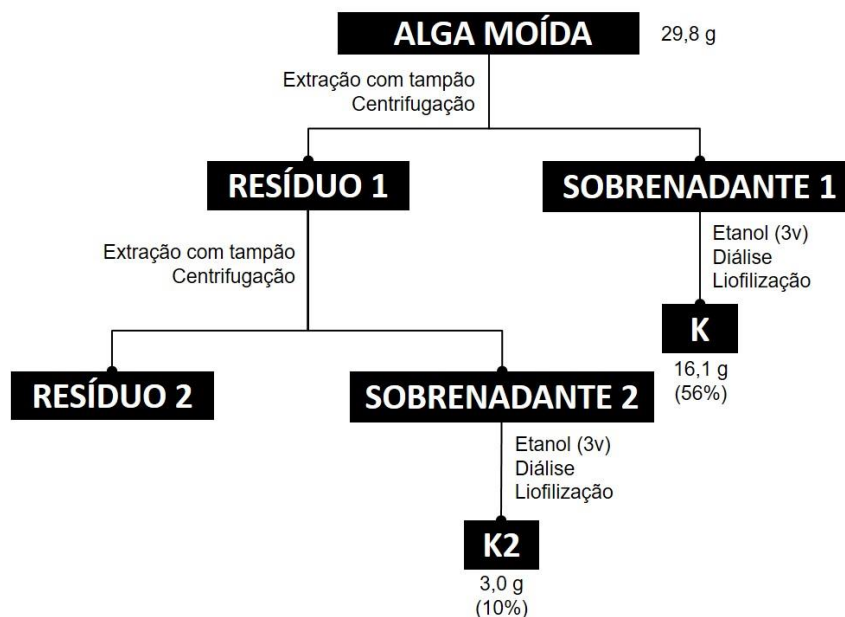
Portanto, a alga *K. alvarezii* foi tratada com KOH 6% por 48 h (Paula *et al.*, 1999) antes de ser submetida a extrações com tampão fosfato. Extrações em meio tamponado são realizadas com o intuito de evitar a auto-hidrólise em função dos grupos sulfato presentes nos polissacarídeos e possíveis perdas de unidades lábeis como 3,6-anidrogallactose, em meio ácido (Miller *et al.*, 1995; Zibetti *et al.*, 2005, 2009).

As diálises dos polissacarídeos contra NaCl 1 mol.L⁻¹ visam obter os polissacarídeos na forma sódica, assim todos os grupos carregados negativamente carregam o mesmo contra íon (FIGURA 10).

As frações polissacarídicas K (16,1 g) e K2 (3,0 g), referentes, respectivamente, à primeira e segunda extrações apresentaram rendimentos de 56 e 10% (m/m), respectivamente, em relação a massa de alga seca submetida aos processos de extração. Este rendimento de polissacarídeos está de acordo com o

obtido por Araújo (2012), que também estudou polissacarídeos obtidos de exemplares cultivados de *K. alvarezii*.

FIGURA 10 - FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DE *Kappaphycus alvarezii*



FONTE: O autor (2013).

7.1.2 Análises químicas das frações polissacarídicas

Os rendimentos e as análises químicas das frações K e K2 obtidas de *K. alvarezii* são apresentados na TABELA 3. As frações polissacarídicas K e K2 exibiram quantidades significativas de sulfato e baixa porcentagem de proteína, o que condiz com as características químicas das carragenanas (Painter, 1983).

TABELA 3 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES OBTIDAS DE *K. alvarezii*

Fração	Rendimento ^a (%)	Carboidrato ^b (%)	Sulfato ^c (%)	Proteína ^d (%)	[α] ^{Df} (°)
K	56	79,0	23,9	1,5	+ 38,2
K2	10	69,3	29,8	-	n.d.

- = não detectado; n.d. = não determinado; ^a Rendimento em relação ao peso seco da alga extraída; ^b, ^c, ^d Determinações de acordo com os métodos de Dubois *et al.* (1956), Dodgson e Price (1962) e Lowry *et al.* (1951), respectivamente; ^f Rotação óptica específica, determinada a 20 °C em solução aquosa 0,2% (m/v).

Destaca-se também que o valor positivo de rotação óptica específica obtida para a fração K está entre os valores determinados para carragenanas, entre +30 e +80° (Lawson *et al.*, 1973).

7.1.3 Tratamento com cloreto de potássio e espectroscopia de RMN da fração K

O tratamento com cloreto de potássio é realizado para fracionar os diferentes tipos de carragenanas, pois íons potássio interagem com regiões negativas de carragenanas com estruturas repetitivas e acabam por neutralizar a repulsão entre as cadeias, facilitando a formação de duplas hélices, que conseqüentemente levam à geleificação. Diferentes galactanas, de acordo com o grau de sulfatação, geleificam em diferentes concentrações de KCl. A concentração de 0,1 mol.L⁻¹ de KCl permite precipitar e fracionar as carragenanas do tipo *kappa* (Cerezo, 1967; Nosedá, 1994).

Assim, uma porção da fração K foi submetida ao tratamento com KCl 0,1 mol.L⁻¹ originando as frações precipitada K-01P e solúvel K-01S, as quais apresentaram rendimentos de 65,3 e 11,3% (m/m), respectivamente, em relação a massa de polissacarídeo tratado com KCl. As frações K, K-01P e K-01S foram analisadas por RMN de ¹H como mostra a FIGURA 11.

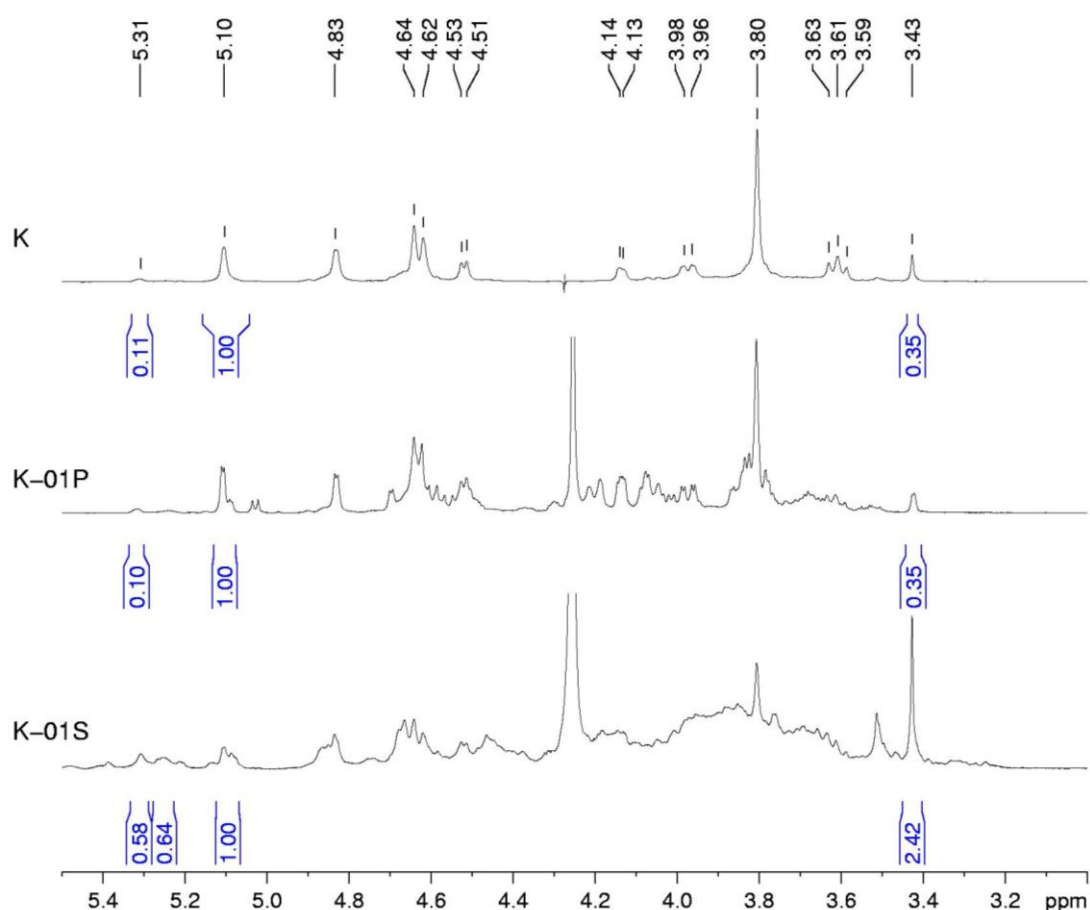
No espectro de RMN de ¹H da fração K destacaram-se os sinais anoméricos em 5,31 e 5,10 ppm, referentes aos hidrogênios anoméricos das unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose 2-sulfato e 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose, encontradas em *iota*- e *kappa*-carragenana, respectivamente, além do sinal em 3,43 ppm correspondente aos hidrogênios dos grupos O-metil de unidades de 6-O-metil- β -D-galactopiranosose 4-sulfato (Estevez *et al.*, 2004). O espectro de RMN de ¹H da fração precipitada K-01P mostrou os mesmos sinais que o espectro de K, enquanto na fração solúvel K-01S foi possível observar na região anomérica os sinais em 5,31, 5,26 e 5,10 ppm, referentes aos hidrogênios anoméricos das unidades alfa encontradas em *iota*- (3,6-anidro- α -D-galactopiranosose 2-sulfato), *mu*- (α -D-galactopiranosose 6-sulfato) e *kappa*-carragenana (3,6-anidro- α -D-galactopiranosose), respectivamente (Van de Velde *et al.*, 2002).

A integração dos sinais anoméricos (regiões demarcadas abaixo de cada espectro, FIGURA 11) de K-01S mostrou que esta fração é composta, respectivamente, por 45, 26 e 29% de *kappa*-, *iota*- e *mu*-carragenana e ainda

apresenta um enriquecimento de unidades de 6-O-metil- β -D-galactopiranosose 4-sulfato (3,43 ppm).

No entanto, a análise comparativa da integração dos sinais anoméricos das frações K e K-01P mostrou que a proporção de *kappa*-carragenana não difere significativamente entre estas frações, pois ambas apresentaram em torno de 90% de *kappa*-carragenana e a mesma proporção de unidades 6-O-metil- β -D-galactopiranosose 4-sulfato. Portanto, optou-se por utilizar a fração K como polissacarídeo de partida para as posteriores modificações químicas.

FIGURA 11 - ESPECTROS DE RMN DE ^1H DAS FRAÇÕES K, K-01P E K-01S



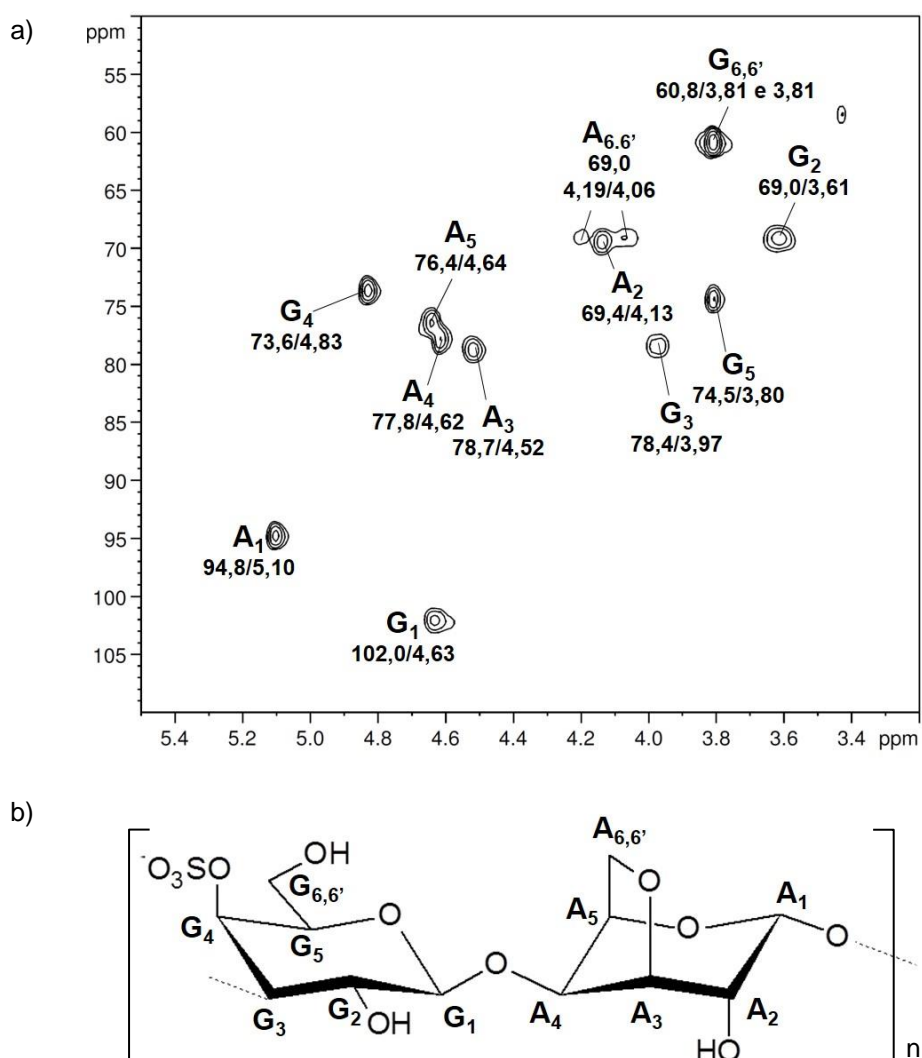
Solvente: D_2O , 70 °C; padrão interno acetona (30,20 e 2,224 ppm). FONTE: O autor (2017).

Assim como demonstrado anteriormente, a análise de RMN de ^1H da fração K obtida de *K. alvarezii* (FIGURA 11) demonstrou que esta fração é composta majoritariamente por *kappa*-carragenana. Os dados de integração dos sinais em 5,31 e 5,10 ppm mostraram que a fração K é composta por 90,5% de *kappa*-carragenana

e 9,5% de *iota*-carragenana, respectivamente. Ainda foi possível observar em 3,80 ppm um intenso sinal referente aos H5 e H6 das unidades de β -D-galactopirranose 4-sulfato da *kappa*- e *iota*-carragenanas (Van de Velde *et al.*, 2002).

A fração K também foi analisada por HSQC, de forma que todos os carbonos e hidrogênios correspondentes à díade de *kappa*-carragenana $\rightarrow 3$ - β -D-Galp 4S-(1 \rightarrow 4)- α -D-3,6-anidro-Galp (1 puderam ser assinalados (Van de Velde *et al.*, 2002; Usov e Shashkov, 1985; Knutsen e Grasdalen, 1992), conforme mostra a FIGURA 12.

FIGURA 12 - ESPECTRO DE HSQC E ASSINALAMENTOS DA *KAPPA*-CARRAGENANA DE *K. alvarezii*



Espectro de HSQC da fração K (a); Esquema da díade $\rightarrow 3$ - β -D-Galp 4S-(1 \rightarrow 4)- α -D-3,6-anidro-Galp (1 com seus respectivos assinalamentos de carbono e hidrogênio (b). Solvente: D₂O, 70 °C; padrão interno acetona (30,20 e 2,224 ppm).

7.2 SULFATAÇÃO DA K-CARRAGENANA

Os processos de sulfatação são realizados, geralmente, em solventes orgânicos polares apróticos. Ao reagir com os agentes sulfatantes as hidroxilas presentes nos monossacarídeos formam ésteres de sulfato. A nucleofilicidade dos reagentes é alterada pelo solvente, portanto o meio reacional provoca alterações nas taxas de sulfatação (Deno e Newman, 1950; Mestechkina e Shcherbukhin, 2010).

Araújo e colaboradores (2013) estudaram diferentes condições de sulfatação da *kappa*-carragenana obtida de *K. alvarezii* variando o tempo de reação e o agente sulfatante. Os autores perceberam que ao utilizar a *kappa*-carragenana na forma de sal de trietilamônio, para melhorar sua solubilidade no meio reacional utilizado para a reação de sulfatação, houve o aumento do grau de sulfatação, de forma que se alcançou a sulfatação das hidroxilas em todas as posições do polissacarídeo.

No presente trabalho, o processo de sulfatação teve por objetivo obter a sulfatação total da fração K, portanto a etapa de formação da *kappa*-carragenana na forma de sal de trietilamônio foi essencial (Araújo *et al.*, 2013). Para tanto, a fração K foi tratada com NaBH₄ para reduzir as extremidades redutoras do polissacarídeo. Então seguiu-se a formação do sal de trietilamônio através de diálise contra solução de trietilamina 3% (m/v) com posterior liofilização. Este procedimento permite que os grupos sulfato levem o como contra íon o trietilamônio, o que facilita a solubilização do polissacarídeo sulfatado no meio reacional.

A fração K (6,7 g) na forma de sal de trietilamônio foi solúvel no meio reacional de sulfatação química. Assim, após sua solubilização em dimetilformamida anidra foram adicionados ao meio reacional 2-metil-2-butenol, que visa reduzir a degradação do polímero (Papy-Garcia *et al.*, 2005), e o agente sulfatante complexo de piridina-trióxido de enxofre. A reação de sulfatação originou a fração de *kappa*-carragenana quimicamente sulfatada, KS (ver FIGURA 9).

7.2.1 Análises químicas da *kappa*-carragenana quimicamente sulfatada

A fração KS apresentou aumento de 8,8% na massa recuperada após o processo de sulfatação química. A dosagem turbidimétrica de grupos sulfato da fração KS mostrou um aumento de aproximadamente 84% de grupos sulfato em relação a fração nativa K e uma concomitante diminuição de carboidratos totais (TABELA 4).

A análise comparativa dos graus de substituição por grupos sulfato das frações nativa K e KS demonstrou que a fração KS apresenta DS de 3,8, o qual representa um elevado grau de substituição, condizente com a condição de sulfatação total utilizada (TABELA 4) (Araújo *et al.*, 2013).

A *kappa*-carragenana é composta por díades de $\rightarrow 3$)- β -D-galactopiranosose 4-sulfato-(1 \rightarrow 4)- α -D-3,6-anidro-galactopiranosose-(1 (TABELA 1). Portanto, a unidade A apresenta a hidroxila de C4 substituída por um grupo sulfato, enquanto as hidroxilas de C2, tanto da unidade A quanto da B, e a hidroxila de C6 da unidade A constituem posições passíveis de sofrer sulfatação química. Assim, existem 4 hidroxilas que não formam ligações glicosídicas, as quais representam as possibilidades de substituição por sulfato. Desta forma, o grau de substituição por grupos sulfato (DS de sulfato), neste caso, é expresso pelo intervalo entre 1 a 4, sendo que a *kappa*-carragenana nativa deve apresentar DS de sulfato igual a 1, enquanto uma *kappa*-carragenana quimicamente sulfatada pode apresentar um DS de sulfato máximo igual a 4.

TABELA 4 - RECUPERAÇÃO E ANÁLISES QUÍMICAS DA FRAÇÃO KS OBTIDA DE *K. alvarezii*

Fração	Recuperação ^a (%)	Carboidrato ^b (%)	Sulfato ^c DS	Sulfato ^d (%SO ₃ Na)	Proteína ^e (%)	[α] ^{Df} (°)
K	-	79,0	1,3	23,9	1,5	+ 38,2
KS	108,8	45,7	3,8	44,0	0,4	+ 21,5

^a Recuperação em relação a massa de polissacarídeo de partida K (6 g); ^{b, d, e} Determinações de acordo com os métodos de Dubois *et al.* (1956), Dodgson e Price (1962) e Lowry *et al.* (1951), respectivamente; ^c Grau de substituição por grupos sulfato, dado por $DS = [306,27 \times S] / [3200 - (102 \times S)]$ (Whistler e Spencer, 1964); ^f Rotação óptica específica, determinada a 20 °C em solução aquosa 0,2% (m/v).

Schafer e Stevens (1996) destacaram que os valores de rotação óptica da *kappa*-carragenana tendem a ser mais altos que os da *iota*-carragenana, a qual apresenta maior DS de sulfato, pois, além do C4 das unidades A, a *iota*-carragenana também apresenta sulfato no C2 das unidades B. Assim, quanto maior o DS de sulfato, mais desordenados são os géis formados pelas carragenanas e menores são os valores de rotação óptica específica destas soluções.

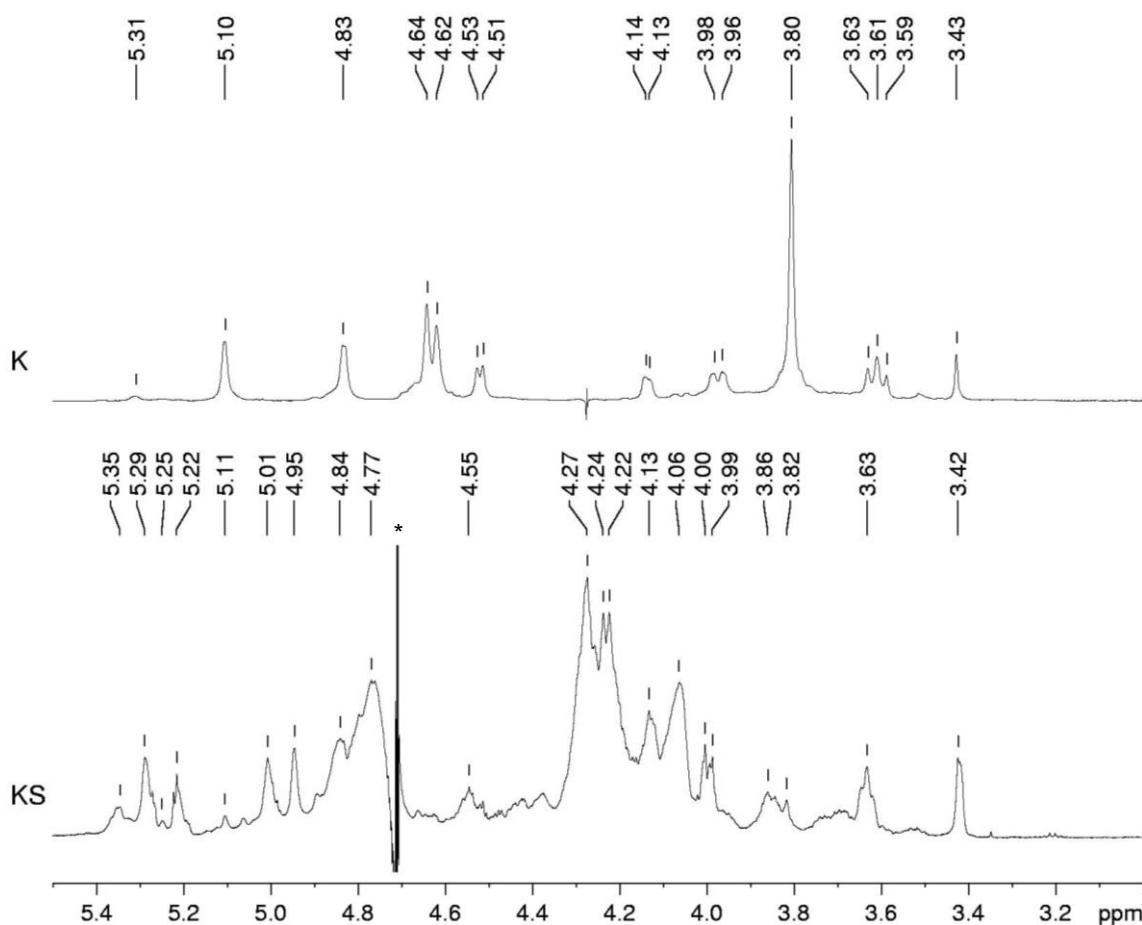
No presente trabalho o processo de sulfatação da *kappa*-carragenana mostrou uma diminuição considerável de 16,7 graus no valor de rotação óptica específica, passando de +38,2 para +21,5° (TABELA 4). É possível sugerir que o maior grau de sulfatação tornou a estrutura do polímero mais desordenada, em função

dos grupos sulfato ocuparem numerosas e diferentes posições no polissacarídeo quimicamente sulfatado, impedindo interações entre as cadeias polissacarídicas.

7.2.2 Espectroscopia de RMN da *kappa*-carragenana quimicamente sulfatada

A *kappa*-carragenana quimicamente sulfatada KS também foi analisada por RMN de ^1H (FIGURA 13) e HSQC. Como esperado, o espectro de RMN de ^1H da fração KS apresentou-se mais complexo do que o espectro de RMN de ^1H da fração K nativa, tendo em vista a variabilidade de ambientes químicos provocados pela adição de grupos sulfato. Os deslocamentos de sinais em função de substituições por éster de sulfato são bem descritos para os carbonos, pois a presença de sulfato altera a ressonância dos carbonos vizinhos e do substituído.

FIGURA 13 - ESPECTROS DE RMN DE ^1H DA K-CARRAGENANA SULFATADA KS E DA KAPPA-CARRAGENANA NATIVA K



Solvente D_2O , 70 e 30 °C; padrão interno acetona (30,2 e 2,224 ppm) (*) artefato do experimento de pressaturação do pico da água. FONTE: O autor (2017).

O carbono substituído por éster de sulfato fica menos blindado e é deslocado para mais ppm. Esta alteração é chamada efeito α , na qual a ressonância do carbono substituído é deslocada para mais 6 a 10 ppm. Os carbonos vizinhos ao carbono substituído sofrem o chamado efeito β , que consiste no deslocamento da ressonância para menos 1 a 2 ppm (Usov, 1984).

Assim, o espectro de RMN de ^1H da fração KS apresentou grande multiplicidade de sinais, principalmente na região anomérica, sugerindo a presença de sulfato em diferentes posições, tanto na unidade A quanto na B (FIGURA 13).

Em relação à fração K, na fração KS houve a diminuição do sinal em 3,80 ppm, referente aos H5 e H6,6' das unidades de β -D-galactose 4-sulfato (G4S). Contudo notou-se o aparecimento do intenso sinal em 4,27 ppm, o qual foi atribuído aos H6,6' das unidades de β -D-galactose 4,6-dissulfato (G4S,6S) e de β -D-galactose 2,4,6-trissulfato (G2S,4S,6S) (Araújo *et al.*, 2013) (FIGURA 13).

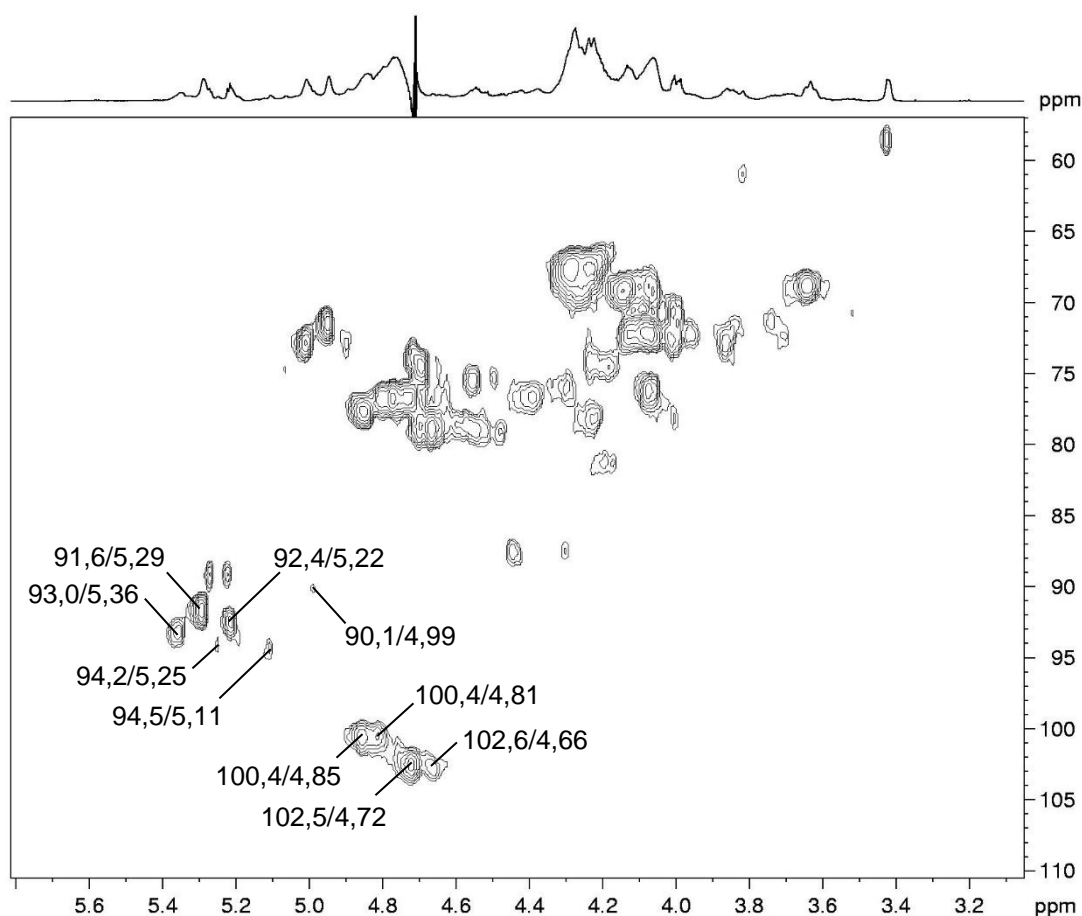
Apesar do considerável grau de substituição observado para a fração KS (DS igual a 3,8, TABELA 4) ainda é possível notar a presença do sinal em 5,11 ppm referente a H1 das unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose das díades G4S-DA, presentes no polissacarídeo nativo K (FIGURA 13). Ainda na região anomérica, destacam-se os sinais em 5,35 e 5,29 ppm, referentes aos H1 das unidades B de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose 2-sulfato (DA2S) ligadas, respectivamente, a β -D-galactopiranosose 2,4,6-trissulfato e β -D-galactopiranosose 4,6-dissulfato (Araújo *et al.*, 2013).

Com auxílio do espectro de HSQC da fração KS (FIGURA 14) e dados da literatura referentes a unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose redutoras, pôde-se atribuir o sinal em 5,22 ppm ao H1 das unidades redutoras de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose 2-sulfato (DA2S_{red}) ligadas a β -D-galactopiranosose 2,4,6-trissulfato, comprovando que o processo de sulfatação promoveu certo grau de hidrólise no polissacarídeo original. O hidrogênio anomérico das unidades redutoras de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose 2-sulfato (DA2S_{red}) ligadas a β -D-galactopiranosose 4,6-dissulfato foram atribuídas ao sinal em 5,25 ppm (Miller *et al.*, 1982; Araújo *et al.*, 2013).

As unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose 2-sulfato (DA2S) foram identificadas pela correlação de C1/H1 em 93,0/5,36 ppm quando ligadas à β -D-galactopiranosose 2,4,6-trissulfato (G2S,4S,6S) e pela correlação de C1/H1 em

91,6/5,29 ppm quando ligadas à β -D-galactopiranosose 4,6-dissulfato (G4S,6S) (Araújo *et al.*, 2013). Os carbonos C1 das unidades DA2S ligadas à G2S,4S,6S e G4S,6S sofreram deslocamentos para menos 1,8 e 3,2 ppm, respectivamente, quando comparados aos C1 das díades nativas de *kappa*-carragenana, ou seja, unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose (DA) ligadas à β -D-galactopiranosose 4-sulfato (G4S) (Knutsen e Grasdalen, 1992) (FIGURA 14).

FIGURA 14 - ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO QUIMICAMENTE SULFATADA KS



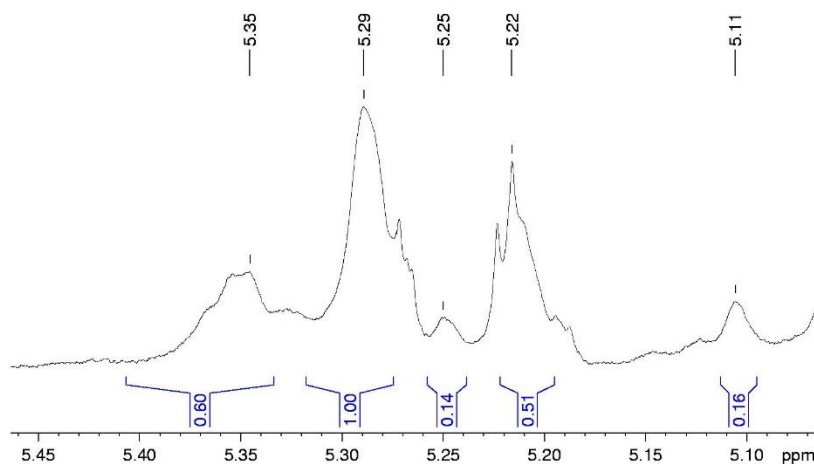
Solvente D₂O, 30 °C; padrão interno acetona (30,2 e 2,224 ppm). FONTE: O autor (2017).

Já os carbonos C2 das unidades DA2S ligadas à G2S,4S,6S e G4S,6S sofreram deslocamentos para mais 4,1 e 5,0 ppm, respectivamente, condizente com a substituição por grupo sulfato em C2. Desta forma, as correlações em 73,5/4,72 e 74,4/4,70 ppm foram atribuídas aos C2/H2 das unidades de DA2S ligadas à G2S,4S,6S e G4S,6S, respectivamente. A correlação em 77,5/4,85 ppm foi atribuída aos C3/H3 das unidades de DA2S ligadas à G2S,4S,6S e G4S,6S, de forma que o C3 das unidades de DA2S mostrou deslocamento de menos 1,2 ppm em relação às

unidades de DA não sulfatadas ligadas à G4S, identificadas pela correlação em 78,7/4,52 ppm na FIGURA 12 (página 22). Este deslocamento é condizente com o efeito β , sofrido pelo C3 das unidades de DA2S em função da substituição por sulfato em C2 (FIGURA 14) (TABELA 5) (Knutsen e Grasdalen, 1992; Miller *et al.*, 1982; Araújo *et al.*, 2013).

Foi possível identificar o efeito α , para os carbonos C6 e C2 das unidades A trissulfatadas (β -D-galactopiranosose 2,4,6-trissulfato, representadas por G2S,4S,6S), os quais apareceram com deslocamentos de mais 6,7 e 5,7 ppm, respectivamente, em relação à fração K, de 60,8 para 67,5 ppm para o C6 e 70,9 para 76,6 ppm para o C2. Do mesmo modo, percebeu-se o deslocamento de menos 1,6 ppm para o C1 das unidades de β -D-galactopiranosose 2,4,6-trissulfato, de 102,0 ppm na fração K para 100,4 ppm para a fração sulfatada KS, o que caracteriza o efeito β (Usov, 1984). Ao C1 das unidades A constituídas por β -D-galactopiranosose 4,6-dissulfato (G4S,6S) foi atribuída a correlação em 102,5/4,72 ppm (TABELA 5).

FIGURA 15 - INTEGRAÇÕES DA REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO QUIMICAMENTE SULFATADA KS



Solvente D_2O , 30 °C; padrão interno acetona (30,2 e 2,224 ppm). FONTE: O autor (2017).

A integração dos sinais da região anomérica do espectro de RMN de ^1H em 5,35, 5,29, 5,25, 5,22 e 5,11 ppm, referentes às unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose (2-sulfato) das díades presentes em KS, permitiu inferir que esta fração é composta por 47,3% de díades de G4S,6S \rightarrow DA2S e 46,2% de díades G2S,4S,6S \rightarrow DA2S, além de 6,5% de díades nativas G4S \rightarrow DA (FIGURA 15). Esta proporção de díades nativas G4S \rightarrow DA corrobora com o DS encontrado para a fração

KS. O DS máximo para *kappa*-carragenana é igual a 4, portanto a *kappa*-carragenana com DS de 3,8 equivale a um polissacarídeo com aproximadamente 5% de díades nativas, valor próximo ao encontrado por meio das integrações no espectro de RMN de ^1H (6,5% de díades nativas G4S→DA) (FIGURA 15).

Assim, as díades majoritárias que compõem a fração quimicamente sulfatada KS são: G2S,4S,6S→DA2S e G4S,6S→DA2S, além das díades redutoras G2S,4S,6S→DA2S red e G4S,6S→DA2S red (FIGURA 16). A presença das díades redutoras mostra que a sulfatação química promoveu degradação do polímero.

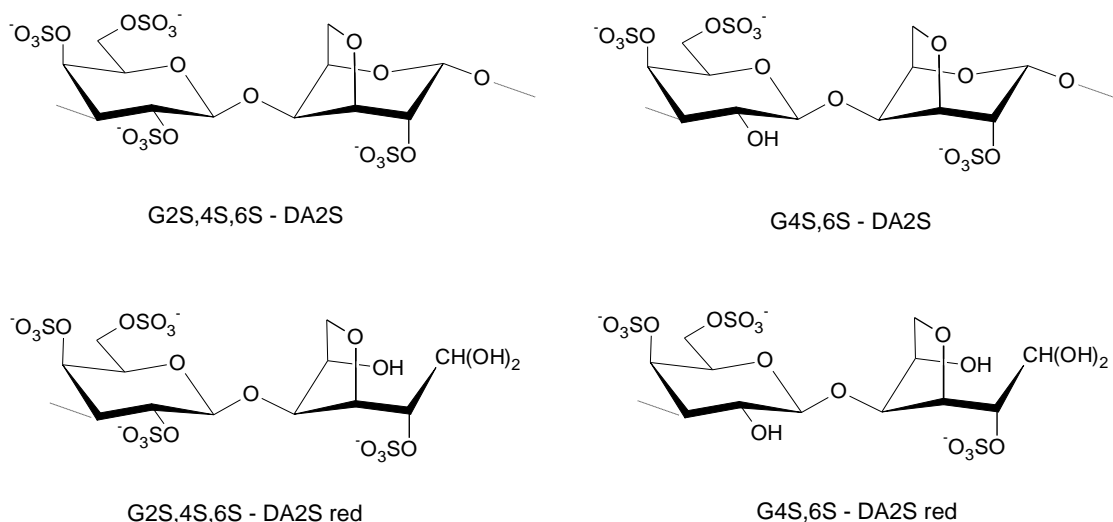
TABELA 5 - ASSINALAMENTOS DAS DÍADES PRESENTES NA FRAÇÃO KS OBTIDA DE *K. alvarezii*

Fração	Díades	C1 H1	C2 H2	C3 H3	C4 H4	C5 H5	C6 H6,6'
KS	G2S,4S,6S →	100,4	76,6	74,3	72,8	72,1	67,5
		4,85	4,39	4,18	5,01	4,07	4,27
	DA2S	93,0	73,5	77,5	78,8	76,6	69,0
		5,35	4,72	4,85	4,67	4,73	4,14
	G2S,4S,6S →	100,4	76,6	74,3	72,8	72,1	67,5
		4,81	4,39	4,18	5,01	4,07	4,27
	DA2S redutora	92,4	75,3	82,2	87,6	76,6	72,7
		5,22	4,55	4,23	4,45	4,77	4,01
	G4S,6S →	102,5	68,7	76,1	71,4	72,7	67,5
		4,72	3,64	4,07	4,95	4,01	4,27
	DA2S	91,6	74,4	77,5	78,5	76,8	69,0
		5,29	4,70	4,85	4,70	4,80	4,14
	G4S,6S →	102,6	68,7	76,1	71,4	72,7	67,5
		4,66	3,64	4,07	4,95	4,01	4,27
	DA2S redutora	94,2	75,3	82,2	87,6	76,6	72,7
		5,25	4,55	4,23	4,45	4,77	4,01
	DA	94,5	-	78,8	-	75,9	-
		5,11	-	4,56	-	4,63	-
	DA redutora	90,1	-	-	-	-	-
		4,99	-	-	-	-	-

- = não detectado; Assinalamentos de acordo com o espectro de HSQC da FIGURA 14 e dados da literatura (Miller *et al.*, 1982; Knutsen e Grasdalen, 1992; Araújo *et al.*, 2013). Solvente D₂O, 70 °C; padrão interno acetona (30,2 e 2,224 ppm).

Os assinalamentos dos carbonos e hidrogênios das díades presentes na fração KS estão apresentados na TABELA 5 e puderam ser realizados por meio da análise do espectro de HSQC (FIGURA 14) em comparação com os dados da literatura (Miller *et al.*, 1982; Knutsen e Grasdalen, 1992; Araújo *et al.*, 2013).

FIGURA 16 - ESQUEMA DAS PRINCIPAIS DÍADES SULFATADAS DA FRAÇÃO KS



Díades sulfatadas G2S,4S,6S→DA2S e G4S,6S→DA2S e díades redutoras G2S,4S,6S→DA2S red e G4S,6S→DA2S red presentes na fração KS e assinaladas de acordo com a TABELA 5.

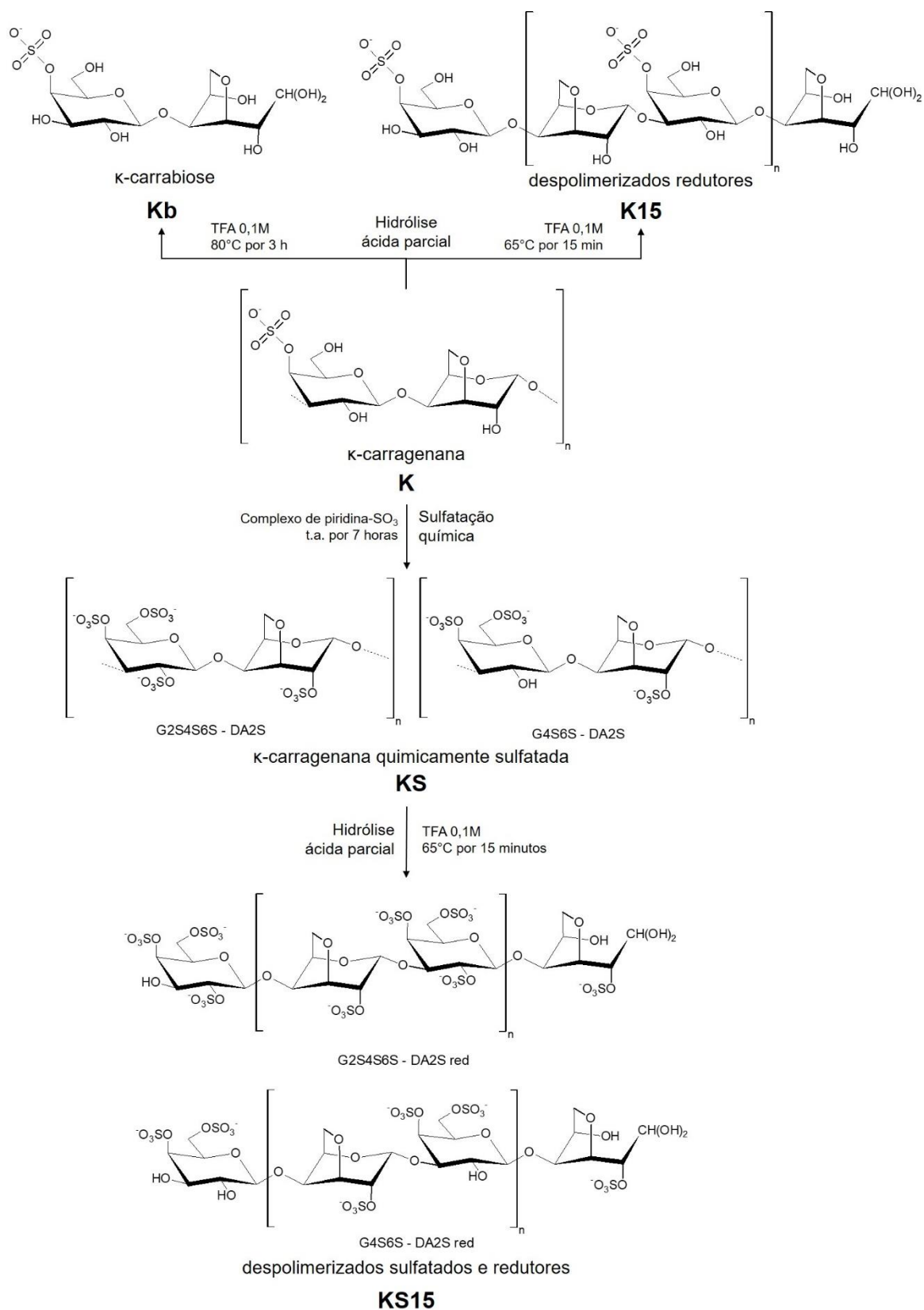
FONTE: O autor (2017).

7.3 PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR DE K E KS

Com o objetivo de se obter dissacarídeos e despolimerizados redutores, as frações de *kappa*-carragenana nativa K e quimicamente sulfatada KS foram submetidas a hidrólise ácida parcial.

A partir da fração K foram obtidas as frações Kb e K15, sendo a primeira obtida por hidrólise ácida nas condições de obtenção de dissacarídeos redutores (Stevenson e Furneaux, 1991), enquanto a segunda foi obtida por hidrólise ácida branda por 15 minutos para obtenção de *kappa*-carragenana de menor massa (Ducatti *et al.*, 2011). Esta mesma condição de hidrólise foi utilizada para obter moléculas de menor massa a partir da fração KS quimicamente sulfatada (FIGURA 17).

FIGURA 17 - OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES REDUTORAS Kb, K15 E KS15 A PARTIR DAS KAPPA-CARRAGENANAS K E KS



FONTE: O autor (2015).

7.3.1 Análises químicas das frações Kb, K15 e KS15

As análises químicas das frações Kb, K15 e KS15 são apresentadas em conjunto com as frações originais K e KS para fins de comparação (TABELA 6).

A fração Kb apresentou maior porcentagem de recuperação ao ser comparada com K15 e KS15. O processo de obtenção de Kb não incluiu diálise, já as frações K15 e KS15, durante o processo de diálise, perderam massa na forma de monossacarídeos e oligossacarídeos, os quais são produzidos na etapa de hidrólise.

As frações Kb, K15 e KS15 mostraram valores de carboidratos totais e proteínas condizentes com as frações que as originaram, assim como apresentaram graus de substituição por sulfato que corroboram suas características estruturais. De forma que as frações Kb e K15, obtidas a partir da *kappa*-carragenana K, mantiveram o DS com valores próximos a 1, equivalente ao sulfato das unidades A de β -D-galactopiranosose 4-sulfato. Enquanto a fração KS15 mostrou maior porcentagem de sulfato e DS próximo a 4, que seria equivalente ao polissacarídeo totalmente sulfatado.

TABELA 6 - RECUPERAÇÃO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES Kb, K15 e KS15 OBTIDAS DE *K. alvarezii*

Fração	Recuperação ^a (%)	Carboidrato ^b (%)	Sulfato ^c DS	Sulfato ^d (%SO ₃ Na)	Proteína ^e (%)	[α] ^{D,f} (°)
K ^g	-	79,0	1,3	23,9	1,5	+ 38,2
Kb	90,0	69,3	1,1	20,4	2,3	+ 14,9
K15	40,0	70,3	1,1	20,8	1,6	+ 18,3
KS ^g	108,8	45,7	3,8	44,0	0,4	+ 21,5
KS15	53,3	51,8	3,7	43,2	0,5	+ 31,4

^a Recuperação em relação a massa dos polissacarídeos de partida; ^{b, d, e} Determinações de acordo com os métodos de Dubois *et al.* (1956), Dodgson e Price (1962) e Lowry *et al.* (1951), respectivamente; ^c Grau de substituição por grupos sulfato, dado por $DS = [306,27 \times S]/[3200 - (102 \times S)]$ (Whistler e Spencer, 1964); ^f Rotação óptica específica, determinada a 20 °C em solução aquosa 0,2% (m/v); ^g Fração incluída para fins comparativos.

Estudos de *kappa*-carragenanas com diferentes graus de polimerização mostraram que a tendência na diminuição dos valores de rotação óptica específica acompanha a redução no grau de polimerização, em leituras realizadas até 30 °C. Assim, quanto menores os graus de polimerização das carragenanas, menores são os valores de rotação óptica (Rochas *et al.*, 1983). Estes dados concordaram com os apresentados por Schafer e Stevens (1996), que discutem sobre as interações entre

as cadeias dos polímeros, de forma que, quanto menor o grau de polimerização, menores as interações entre as moléculas e, portanto, menores os valores de rotação óptica específica. Os resultados do presente trabalho mostraram que as rotações ópticas específicas (+38,2 > +21,5 > +18,3 > +14,9) diminuem conforme diminui o grau de polimerização das carragenanas K > KS > K15 > Kb. A fração hidrolisada sulfatada KS15 mostrou diminuição da rotação óptica apenas em relação a fração polissacarídica nativa K.

7.3.2 Espectroscopia de RMN das frações Kb, K15 e KS15

As frações Kb e K15, obtidas por meio de dois diferentes processos de hidrólise da fração original K, e a fração KS15, obtida da hidrólise branda da fração quimicamente sulfatada KS (FIGURA 17), foram analisadas por RMN de ^1H e HSQC.

Os espectros de RMN de ^1H das frações Kb e K15 são apresentados juntos ao espectro da fração original K na FIGURA 18.

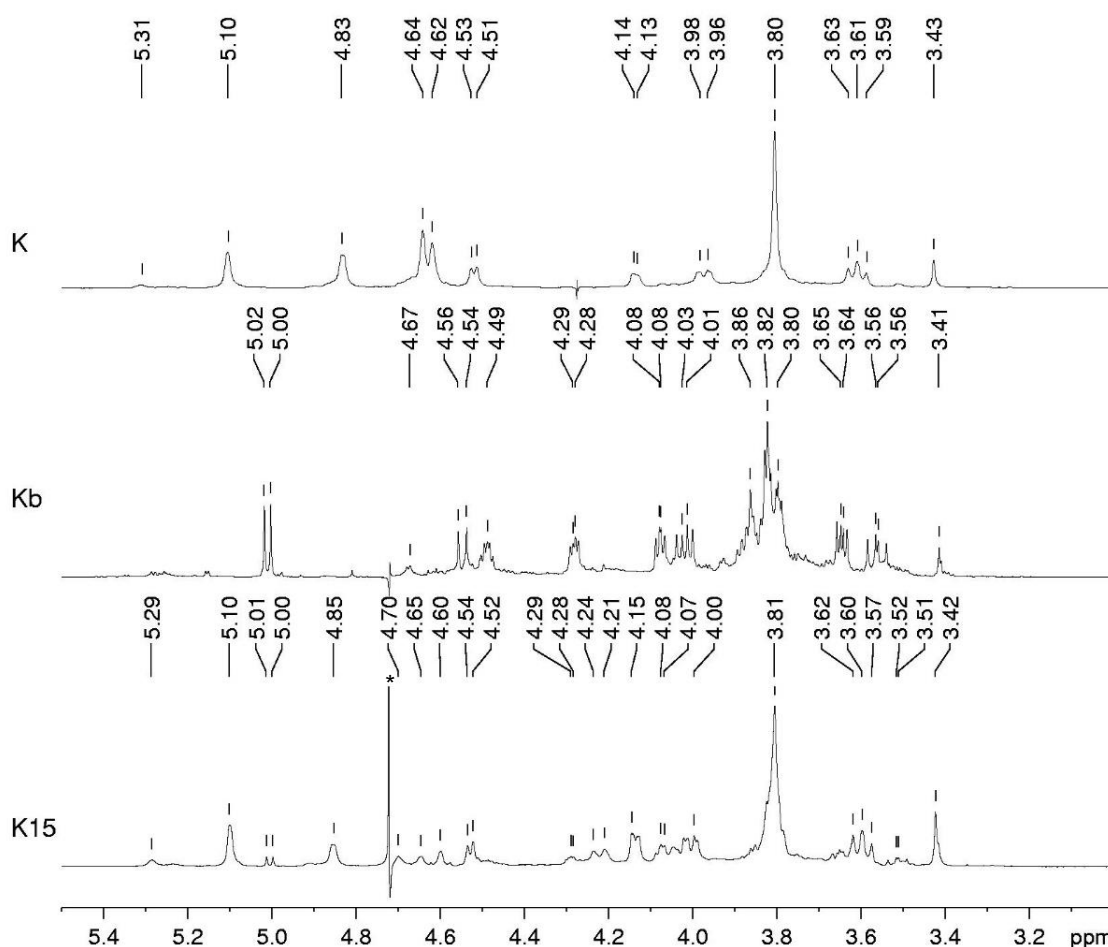
Na região anomérica do espectro de RMN de ^1H da fração Kb destacou-se o intenso sinal (duplete) centrado em 5,01 ppm, atribuído ao H1 das unidades 3,6-anidro- α -D-galactopirranose, as quais encontraram-se na forma de aldeído hidratado após a hidrólise ácida (FIGURA 19) (Miller et al., 1982; Ducatti et al., 2011).

A integração dos sinais da região anomérica do espectro de ^1H da fração Kb indicou a presença de 80% de *kappa*-carrabiose (5,01 ppm), enquanto os outros hidrogênios foram atribuídos a oligossacarídeos com maior grau de polimerização de *kappa*-carragenana (5,16 ppm) ou *iota*-carragenana (5,28 ppm) (Briones e Sato, 2014; Jouanneau et al., 2010; Knutsen e Grasdalen, 1992).

O espectro de RMN de ^1H da fração K15 mostrou uma mescla de sinais já observados tanto para a fração K quanto para Kb. A região anomérica do espectro de ^1H apresentou sinais de H1 das unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopirranose internas e redutoras em 5,10 e 5,01 ppm, respectivamente, mostrando que esta fração apresenta fragmentos redutores de *kappa*-carragenana maiores que dissacarídeos. A integração dos sinais em 5,29, 5,10 e 5,01 ppm, mostrou uma relação de 15:74:11 de unidades B de *iota*-carragenana, *kappa*-carragenana interna e *kappa*-carragenana redutora, respectivamente (Jouanneau et al., 2010; Knutsen e Grasdalen, 1992; Miller et al., 1982). Assim, a fração K15 apresentou uma proporção de 15% de *iota*-carragenana para 85% de *kappa*-carragenana.

Portanto, destaca-se que a fração K15 constitui uma mistura enriquecida por díades de *iota*- e *kappa*-carragenana (retida em membrana de diálise MWCO 12-14 KDa), de maneira que a despolimerização fica evidente pela presença das unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopiranoses redutoras.

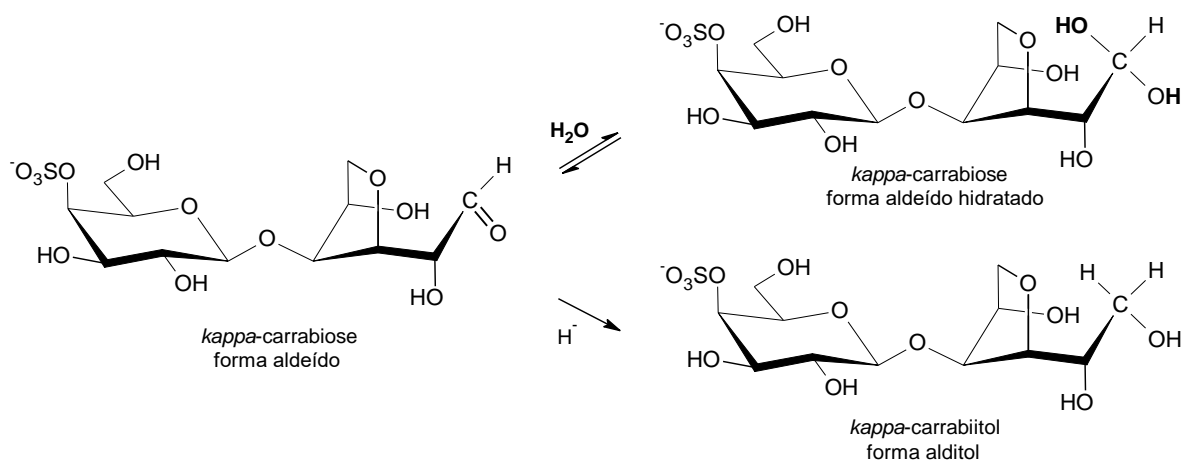
FIGURA 18 - ESPECTROS DE RMN DE ^1H DAS *KAPPA*-CARRAGENANAS HIDROLISADAS Kb E K15 E DA *KAPPA*-CARRAGENANA NATIVA K



Solvente D_2O , 70 e 30 $^{\circ}\text{C}$; padrão interno acetona (30,2 e 2,224 ppm); (*) artefato do experimento de pressaturação do pico da água. FONTE: O autor (2017).

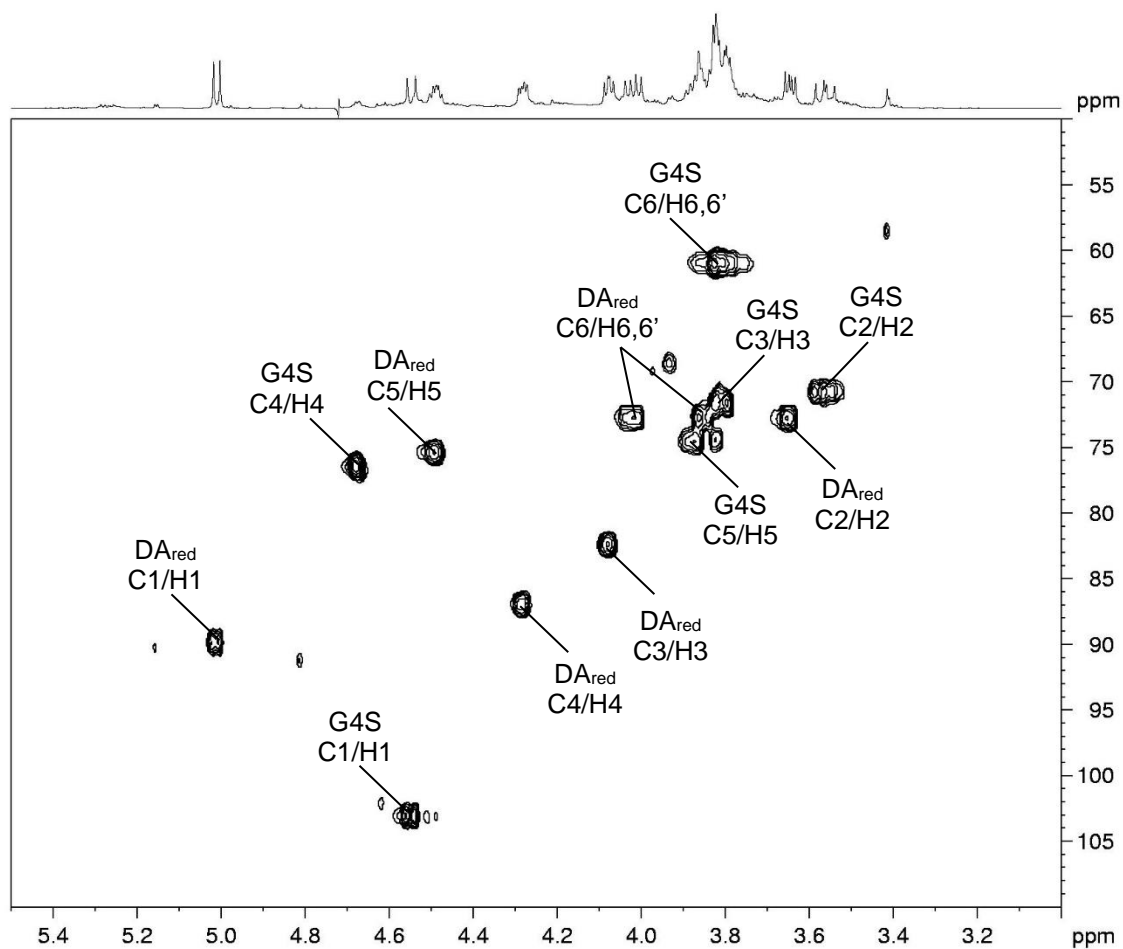
As frações Kb e K15 também foram analisadas por HSQC. A fração K15 (espectro não apresentado) apresenta sinais de díades $\text{G4S} \rightarrow \text{DA}$ internas e redutoras. O espectro de HSQC da fração Kb (FIGURA 20) permitiu identificar as correlações do dissacarídeo redutor de *kappa*-carragenana, demonstrando que a fração Kb é composta majoritariamente por *kappa*-carrabiose $\text{G4S} \rightarrow \text{DA}_{\text{red}}$ (FIGURA 19).

FIGURA 19 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA *KAPPA*-CARRABIOSE (FORMA ALDEÍDO E ALDEÍDO HIDRATADO) E *KAPPA*-CARRABIITOL (FORMA ALDITOL)



FONTE: O autor (2017).

FIGURA 20 - ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO Kb OBTIDA DE *K. alvarezii*



Solvente D_2O , 30 °C; padrão interno acetona (30,2 e 2,224 ppm). FONTE: O autor (2017).

Uma porção da fração Kb foi reduzida com NaBH₃CN e resultou na fração KbRZ (espectro não mostrado), a qual também foi analisada por HSQC em comparação com a fração Kb, com o intuito de verificar os deslocamentos químicos dos sinais de *kappa*-carrabiose (Kb) e *kappa*-carrabitol (KbRZ) (FIGURA 19).

A partir dos dados de HSQC e os dados da literatura, os assinalamentos dos dissacarídeos Kb e KbRZ, bem como da mistura de *kappa*-oligossacarídeos da fração K15 puderam ser sumarizados na TABELA 7 (Miller *et al.*, 1982; Ducatti *et al.*, 2011; Usov e Elashvili, 1991, 1997; Gonçalves *et al.*, 2005; Van de Velde *et al.*, 2002; Usov e Shashkov, 1985).

TABELA 7 – ASSINALAMENTOS DE ¹³C E ¹H DAS FRAÇÕES Kb, KbRZ E K15 OBTIDAS DE *K. alvarezii*

Frações	Díades	C1 H1,1'	C2 H2	C3 H3	C4 H4	C5 H5	C6 H6,6'
K ^a	G4S →	102,0	69,0	78,4	73,6	75,5	60,8
		4,63	3,61	3,97	4,83	3,80	3,81/3,81
	DA	94,8	69,4	78,7	77,8	76,4	69,0
		5,10	4,13	4,52	4,62	4,64	4,19/4,06
Kb	G4S →	103,1	70,7	71,5	76,4	74,4	60,9
		4,55	3,56	3,80	4,68	3,86	3,82/3,82
	DA redutora	89,9	72,7	82,3	86,9	75,3	72,7
		5,00/5,02	3,65	4,08	4,28	4,49	4,01/3,86
KbRZ	G4S →	102,9	70,9	71,9	76,4	74,3	60,9
		4,53	3,57	3,79	4,69	3,85	3,81/3,81
	DA reduzida	62,5	71,5	83,6	87,1	75,6	72,7
		3,72/3,65	3,92	3,91	4,17	4,47	4,00/3,85
K15	G4S →	102,0	68,9	77,7	73,3	74,3	60,8
		4,65	3,60	4,00	4,85	3,81	3,80/3,80
	DA	94,3	69,0	78,7	77,9	76,2	68,9
		5,10	4,13	4,52	4,60	4,65	4,22/4,06
	G4S →	102,3-103,0	70,6	71,8	76,5	74,2	60,8
		4,60-4,50	3,51	3,79	4,67	3,85	3,80/3,80
	DA redutora	90,0	72,9	82,3	86,9	75,4	72,5
		5,00/5,02	3,65	4,08	4,29	4,49	4,02/3,85

^a Fração nativa K incluída para efeito de comparação (FIGURA 12, página 77); Frações: Kb, *kappa*-carrabiose (Miller *et al.*, 1982; Ducatti *et al.*, 2011); KbRZ, *kappa*-carrabitol (Usov e Elashvili, 1991, 1997; Gonçalves *et al.*, 2005); K15, mistura de oligossacarídeos redutores de *kappa*-carragenana (Van de Velde *et al.*, 2002; Usov e Shashkov, 1985). Assinalamentos de acordo com os respectivos espectros de HSQC. Solvente D₂O, 70 °C; padrão interno acetona (30,2 e 2,224 ppm).

A partir dos assinalamentos obtidos por HSQC apresentados na TABELA 7 destacaram-se os sinais característicos que diferenciam as unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopirranose redutoras das unidades reduzidas a 3,6-anidro- α -D-galactitol.

As unidades redutoras, na forma de aldeído hidratado, apresentaram a correlação C1/H1,1' em 89,9/5,00; 5,02 ppm, enquanto que as unidades de 3,6-anidro- α -D-galactitol mostraram o C1 reduzido a álcool em 62,5 ppm e os hidrogênios H1,1' em 3,72 e 3,65 ppm. Adicionalmente, as correlações C2/H2, C3/H3 e C4/H4 também sofreram deslocamentos em função da redução do grupo aldeído e foram atribuídas as correlações em 71,5/3,92, 83,6/3,91 e 87,1/4,17 ppm, respectivamente (Miller *et al.*, 1982; Ducatti *et al.*, 2011; Gonçalves *et al.*, 2005) (TABELA 7).

O espectro de RMN de ^1H da fração hidrolisada KS15 é apresentado junto ao espectro da fração original quimicamente sulfatada KS na FIGURA 21.

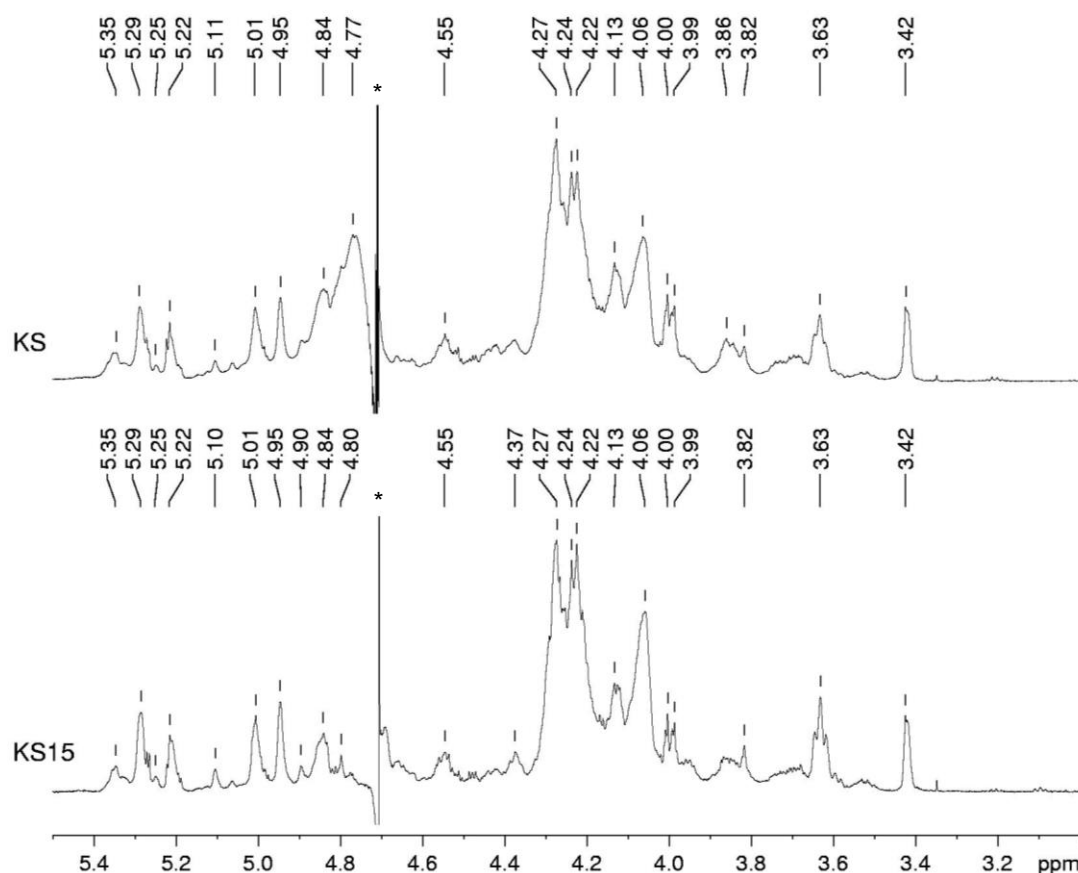
É possível observar a grande semelhança entre as frações, no entanto a partir da integração dos sinais em 5,35; 5,29; 5,25; 5,22 e 5,10 ppm na região anomérica do espectro de RMN de ^1H da fração hidrolisada KS15, destaca-se que esta difere da fração original KS em função da alteração das proporções das díades sulfatadas.

A fração KS15 apresenta 49,0% de díades de G4S,6S \rightarrow DA2S, 43,8% de díades totalmente sulfatadas G2S,4S,6S \rightarrow DA2S e 7,2% de díades nativas G4S \rightarrow DA.

O processo de hidrólise da fração KS promoveu redução na porcentagem de díades totalmente sulfatadas G2S,4S,6S \rightarrow DA2S (de 46,2% no polímero original KS para 43,8% no hidrolisado KS15). Isto se deve à perda de grupos sulfato em C2 das unidades de β -D-galactopirranose, o que refletiu em um enriquecimento de 3,6% das díades de G4S,6S \rightarrow DA2S em relação à KS.

A estabilidade dos grupos éster de sulfato substituintes está relacionada a unidade monossacarídica a qual pertencem, bem como a posição que ocupam. A hidrólise de grupos sulfato em C2 de unidades de β -D-galactopirranose ocorre durante processos de hidrólise reductiva parcial de agaranas e carragenanas (Gonçalves *et al.*, 2002 e 2005; Zibetti *et al.*, 2005 e 2009). Na auto-hidrólise de *lambda*- e *theta*-carragenanas também são observados hidrólise e decréscimo de unidades de β -D-galactopirranose, além da perda preferencial de grupos sulfato em C2 (Nosedá e Cerezo, 1993).

FIGURA 21 - ESPECTROS DE RMN DE ^1H DA *KAPPA*-CARRAGENANA SULFATADA E HIDROLISADA KS15 E DA *KAPPA*-CARRAGENANA SULFATADA KS



Solvente D_2O , 30 °C; padrão interno acetona (30,2 e 2,224 ppm) (*) artefato do experimento de pressaturação do pico da água. FONTE: O autor (2017).

Assim, a hidrólise ácida parcial da fração KS indicou que há perda de grupos sulfato em C2 das unidades A, alterando, assim, a proporção entre os tipos de díades sulfatadas encontradas na fração quimicamente sulfatada antes e após hidrólise.

A hidrólise preferencial dos grupos sulfato em C2 das unidades de β -D-galactopiranoose pode estar refletida na discreta diminuição do DS de sulfato encontrada para a fração hidrolisada KS15 (TABELA 6).

Adicionalmente, nota-se que, mesmo presentes em maior proporção na fração hidrolisada, as díades do tipo $\text{G4S,6S} \rightarrow \text{DA2S}$ se mantêm estáveis em relação a proporção de díades internas e redutoras após a hidrólise. Tanto KS quanto KS15 apresentaram 80% das díades $\text{G4S,6S} \rightarrow \text{DA2S}$ internas e 12% na forma redutora.

No entanto, dentre as díades $\text{G2S,4S,6S} \rightarrow \text{DA2S}$ presentes na fração hidrolisada KS15 observou-se o aumento de díades redutoras em aproximadamente 33% em relação à fração original KS.

Deste modo, as díades $G4S,6S \rightarrow DA2S$ parecem ser mais resistentes à hidrólise ácida do que as díades totalmente sulfatadas $G2S,4S,6S \rightarrow DA2S$, posto que aquelas mantêm a proporção de unidades internas e redutoras após hidrólise, enquanto estas exibem maior proporção de unidades 3,6-anidro- α -D-galactopirranose 2-sulfato redutoras. Portanto, possivelmente, dentre os fragmentos que compõem a fração KS15, os menores sejam formados por fragmentos oligossacarídicos ricos em díades $G2S,4S,6S \rightarrow DA2S$ e os maiores consistam em díades $G4S,6S \rightarrow DA2S$.

Certa resistência na hidrólise das ligações 3,6-anidroglicosídicas pode ocorrer quando esta se encontra próxima a substituições por grupos sulfato. Foi observado que durante a produção de dissacarídeos a partir de agarose 6-sulfato, *kappa*- e *theta*-carragenanas, por meio de hidrólise redutiva parcial, foram obtidos apenas dissacarídeos de agarose 6-sulfato, enquanto as carragenanas originaram di- e tetrassacarídeos. O grupo 6-O-sulfato da agarose encontra-se a três ligações de distância da ligação glicosídica envolvendo a unidade de 3,6-anidrogalactose, enquanto os grupos sulfato da *kappa*- e *theta*-carragenanas são ligados aos carbonos que estão a apenas uma ligação de distância dos carbonos da ligação glicosídica. Assim, concluiu-se que as substituições por grupos sulfato podem causar maior resistência das ligações *alfa*-glicosídicas à hidrólise (Gonçalves *et al.*, 2005).

O espectro de HSQC da fração hidrolisada KS15 mostrou as mesmas correlações que a fração original KS, apresentando diferenças relacionadas apenas às proporções das unidades constituintes, as quais foram discutidas anteriormente.

7.3.3 Análise de HPSEC-MALLS-RI das frações de *kappa*-carragenana

O valor de dispersão de um sistema está relacionado à variação entre o número de moléculas e suas massas molares. Quanto maior o número de moléculas de maior massa, menos disperso será o sistema. Assim, moléculas que possuem pequenas massas não influenciam tanto o sistema como aquelas moléculas com grandes massas, as quais alteram o sistema mesmo quando presentes em pequenas quantidades (Lucas *et al.*, 2001).

A dispersão (\bar{D}) de um sistema pode ser calculada pela relação entre as massas molares ponderal média (M_w) e numérica média (M_n) ($\bar{D} = M_w/M_n$) (TABELA 8). Assim, a dispersão calculada para a fração K foi igual a 2,6. Este valor encontra-se de acordo com o valor de dispersão determinado para *kappa*-carragenana em solução aquosa a temperatura ambiente ($\bar{D} = 2,7$) (Wahlund, 2002).

Isto pôde ser observado no cromatograma de HPSEC-MALLS-RI da fração K (FIGURA 22a), no qual se observou uma pequena quantidade de moléculas detectadas por MALLS (tempo de retenção do pico = ~38 min), resultando no perfil heterogêneo. A massa molar ponderal média relativa da fração K foi igual a 97.097 g.mol⁻¹ (página 66).

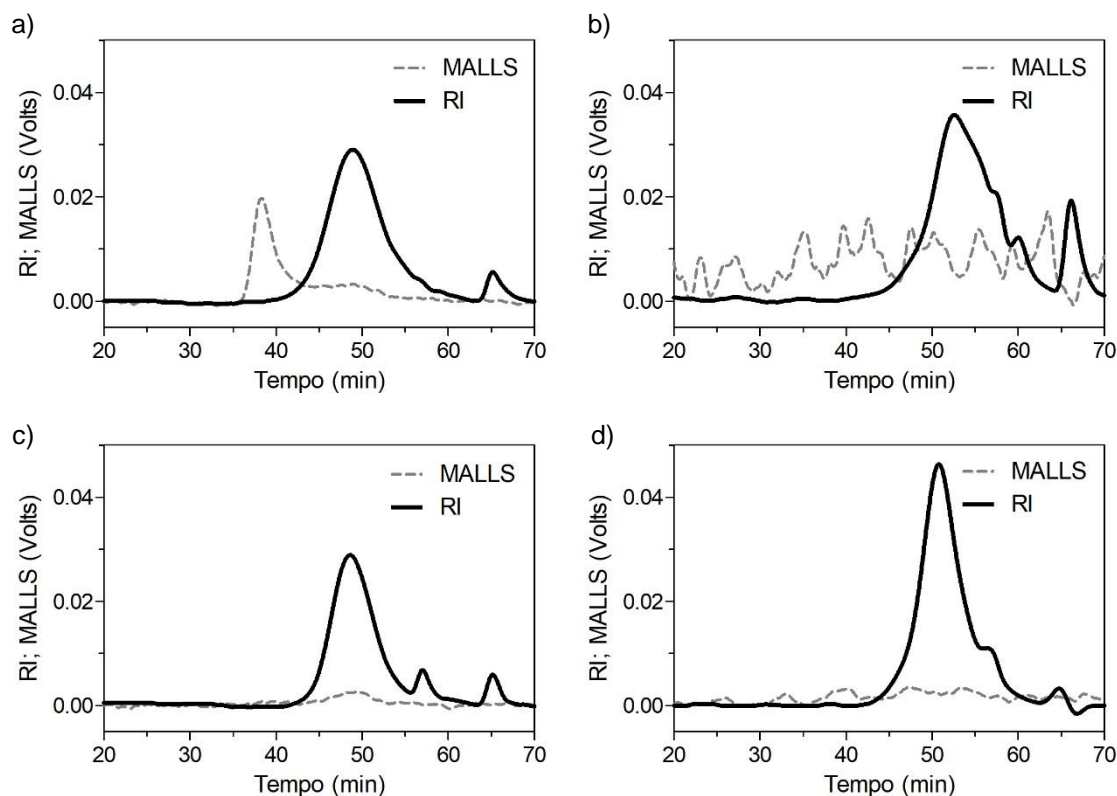
TABELA 8 - VALORES DE MASSA MOLAR PONDERAL MÉDIA (M_w) RELATIVA E ESTIMADA POR HPSEC-MALLS-RI, MASSA MOLAR NUMÉRICA MÉDIA (M_n) ESTIMADA POR HPSEC-MALLS-RI E DISPERSÃO (\bar{D}) DAS FRAÇÕES K, K15, KS e KS15 OBTIDAS DE *K. alvarezii*

Fração	M_w relativa ^a (g.mol ⁻¹)	M_w estimada ^b (g.mol ⁻¹)	M_n estimada ^b (g.mol ⁻¹)	Dispersão (\bar{D}) ^c (M_w/M_n)
K	97.097	51.450	19.820	2,6
K15	75.343	-	-	-
KS	99.069	-	-	-
KS15	85.294	-	-	-

- = não determinado, em função da falta de detecção pelo detector MALLS (90°); ^a Massas molares ponderais médias (M_w) relativas à regressão linear realizada com galactanas sulfatadas obtidas por Colodi, 2011; ^b Valores de massa molar ponderal média (M_w) e massa molar numérica média (M_n) estimadas por HPSEC-MALLS-RI por meio do Software ASTRA; ^c Valor de dispersão calculado pela relação entre os valores de M_w e M_n estimados por HPSEC-MALLS-RI.

As frações nativa (K) e quimicamente sulfatada (KS) (M_w relativa = 99.069 g.mol⁻¹) apresentaram perfis cromatográficos de RI similares, com tempos de retenção iguais a 48,92 e 48,63 minutos, respectivamente (FIGURA 22a e c). Esperava-se menor tempo de retenção para a fração sulfatada quimicamente, em função do incremento na massa pela adição de grupos sulfato. No entanto, a sulfatação resultou no acréscimo de apenas 14% na massa da *kappa*-carragenana nativa K. Assim, é possível, em conjunto com a diminuição dos carboidratos totais da fração KS, concluir que, apesar da adição de 2-metil-2-butenol ao meio reacional, houve degradação parcial do polímero durante a reação de sulfatação, caso contrário o aumento de massa para KS seria maior que 14%.

FIGURA 22 - CROMATOGRAMAS DE HPSEC-MALLS-RI DAS *KAPPA*-CARRAGENANAS K, K15, KS E KS15



Cromatogramas de HPSEC-MALLS-RI com o detector MALLS (90°) e índice de refração (RI) plotados em relação ao tempo de retenção (min). Frações a) K, b) K15, c) KS e d) KS15. FONTE: O autor (2017).

As frações K15 e KS15 (FIGURA 22b e d, respectivamente) tiveram massas molares ponderais médias relativas iguais a 75.343 e 85.294 g.mol⁻¹, respectivamente. A massa molar teórica da fração Kb é de 408 g.mol⁻¹ e refere-se aos dissacarídeos de *kappa*-carragenana na forma sódica.

O detector MALLS (90°) do equipamento de HPSEC-MALLS-RI apresentou detecção apenas para a fração K, de maior massa molar, portanto, estão presentes na forma de ruído para as frações K15, KS e KS15 (FIGURA 22b, c e d, respectivamente).

O perfil cromatográfico detectado por RI da fração K15 mostrou um pico principal (tempo de retenção = 52,58 min) de base alargada, que corresponde ao hidrolisado da fração K em presença de TFA 0,1 mol.L⁻¹, por 15 minutos a 65 °C (FIGURA 22b). Destaca-se que para a fração K15 não houve detecção de *kappa*-carragenana de alta massa molar, em aproximadamente 38 minutos, como na fração original K (FIGURA 22a). A massa molar ponderal média relativa da fração K15 foi igual a 75.343 g.mol⁻¹, sendo 1,3 vez menor que da fração nativa K.

A fração KS15 apresentou um pico principal com tempo de retenção de 50,79 minutos indicado pelo detector RI (FIGURA 22d). A comparação dos cromatogramas de RI das frações KS e KS15 mostrou o maior tempo de retenção da fração hidrolisada KS15 em relação a original KS. Assim, a massa molar ponderal média relativa de KS15 (M_w relativa = 85.294 g.mol⁻¹) foi 1,2 vez menor que a da fração sulfatada KS.

Neste item foram demonstradas a caracterização química da fração K de *kappa*-carragenana extraída da alga *K. alvarezii*, bem como a caracterização da fração Kb, enriquecida em dissacarídeos redutores de *kappa*-carragenana. A fração K15 é composta por uma mistura de despolimerizados de *kappa*-carragenana. Adicionalmente, a fração quimicamente sulfatada KS foi caracterizada em relação aos tipos e proporções de díades sulfatadas que a compõem, da mesma forma que a fração hidrolisada KS15, enriquecida em díades de carragenana sulfatadas.

A sulfatação química da *kappa*-carragenana já foi realizada por outros autores (Araújo *et al.*, 2013), no entanto sua hidrólise parcial constitui um procedimento inédito e traz perspectivas para investigações adicionais, tendo em vista que o padrão de sulfatação do polissacarídeo parece influenciar a dinâmica da hidrólise das ligações 3,6-anidrogalaactosídicas, como mencionado no presente trabalho (página 93).

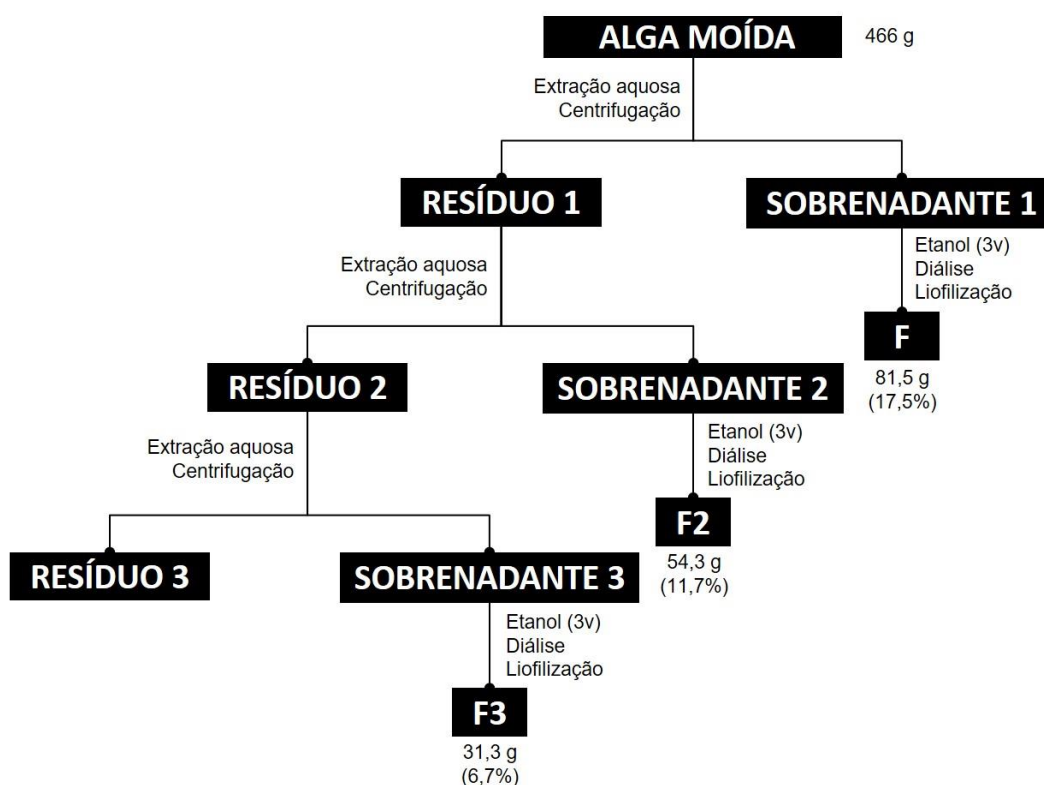
As frações obtidas de *kappa*-carragenana foram testadas em relação a atividade anticoagulante (página 188), enquanto a fração Kb foi utilizada como modelo de molécula redutora que permitiu otimizar as condições de aminação redutiva utilizada para promover a ligação de moléculas redutoras aos grupos amino inseridos nos derivados de ulvana (páginas 119 e 157), permitindo, assim, a semissíntese dos polissacarídeos híbridos-amida e híbridos amina (páginas 141 e 172).

7.4 OBTENÇÃO E ANÁLISE QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS DA ALGA VERDE *Ulva fasciata*

7.4.1 Extração e obtenção dos polissacarídeos

A alga verde *Ulva fasciata* após extrações aquosas, originou as frações F, F2 e F3, respectivamente (FIGURA 23). Considerando o rendimento, a fração F foi selecionada como fonte de ulvanas do presente estudo. A fração F2 foi cedida para outros estudos de modificações químicas do grupo de pesquisa GLICAM, UFPR. Desta forma são apresentados a seguir os dados da fração F e alguns dados de caracterização da fração F3.

FIGURA 23 - FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DA ALGA VERDE *Ulva fasciata*



FONTE: O autor (2017).

7.4.2 Análises químicas das frações F e F3

As frações polissacarídicas F e F3 obtidas de *Ulva fasciata* apresentaram-se sulfatadas (21,2 a 16,7%) e mostraram baixas porcentagens de proteína. Os rendimentos de polissacarídeos em relação ao peso seco da alga também estão de acordo com os obtidos para algas do gênero *Ulva*, bem como a rotação óptica negativa que reflete a presença de α -L-ramnose como monossacarídeo majoritário (Lahaye e Robic, 2007) (TABELA 9).

TABELA 9 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS F E F3 OBTIDAS DE *U. fasciata*

Frações	Rendimento ^a (%)	Carboidrato ^b (%)	Sulfato ^c (%)	Urônicos ^d (%)	Proteína ^e (%)	[α] ^{Df} (°)
F	17,5	72,4	21,2	21,9	1,3	- 75,5
F3	6,7	70,2	16,7	15,1	1,6	n.d.

n.d. = não determinado; ^a Rendimento em relação ao peso seco da alga; ^{b, c, d, e} Determinações de acordo com os métodos de Dubois *et al.* (1956), Dodgson e Price (1962), Filisetti-Cozzi e Carpita (1991) e Lowry *et al.* (1951), respectivamente; ^f Rotação óptica específica, determinada a 20 °C em solução aquosa 0,2% (m/v).

7.4.3 Composição monossacarídica das frações F e F3

Os monossacarídeos majoritários presentes na fração F são α -L-ramnose, β -D-xilose e ácidos urônicos, assim como esperado para ulvanas (Lahaye e Robic, 2007) (TABELA 10). A composição monossacarídica das frações F e F3 foram ajustadas em relação a porcentagem de carboidratos totais para considerar os ácidos urônicos, que foram quantificados por método colorimétrico, pois não são detectados por CG-EM.

A carboxila dos ácidos urônicos exerce efeitos estéricos e/ou indutivos nos átomos de oxigênio das ligações glicosídicas promovendo a resistência destas ligações à hidrólise ácida. Os fragmentos resistentes à hidrólise não podem ser derivatizados de forma correta e, portanto, não são volatilizados durante a técnica de CG-EM, não sendo detectados (BeMiller, 1967).

A fração F3 apresentou como monossacarídeo majoritário a glucose. Esta fração foi obtida da terceira extração aquosa, assim, a alta porcentagem de glucose foi atribuída à glucose derivada da extração parcial dos polissacarídeos de reserva (Bryhni, 1978). Para efeito de cálculo, ao zerar a porcentagem de glucose da fração F3, notou-se que esta apresentou as mesmas proporções de ramnose, xilose e ácidos

urônicos da fração F, demonstrando que esta fração é composta por uma mistura de ulvana e polissacarídeos de reserva das algas verdes.

TABELA 10 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES F E F3 OBTIDAS DE *U. fasciata*

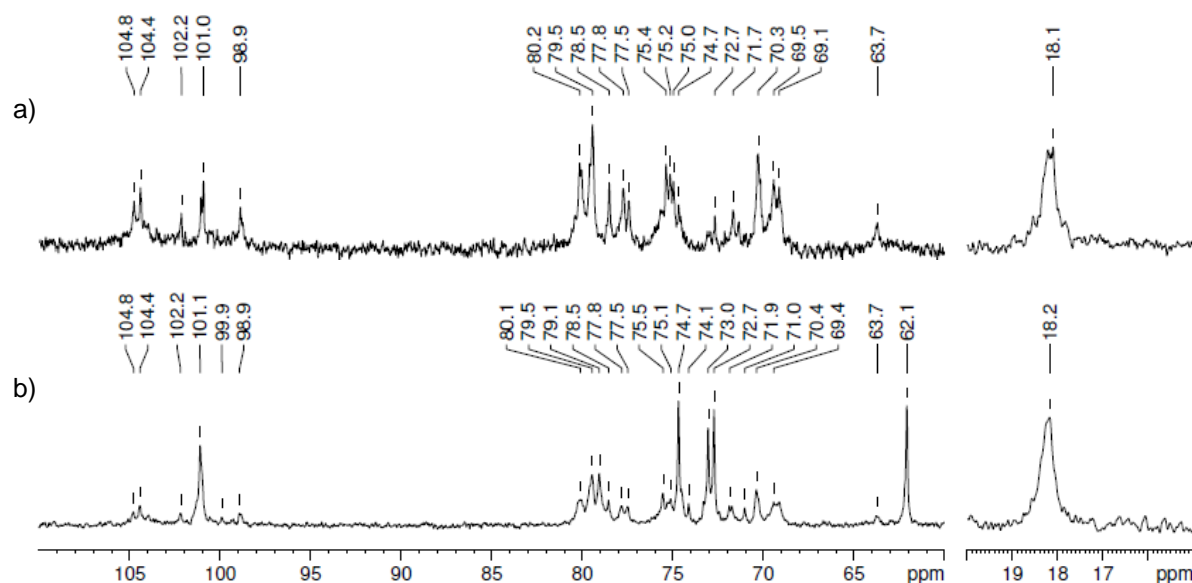
Frações	Composição monossacarídica (mol%)				
	Rha ^a	Xyl	Gal	Glc	Urônicos ^b
F	49,0	13,2	2,0	5,7	30,2
F3	23,5	9,2	0,9	45,0	21,5

^a Rha = ramnose, Xyl = xilose, Gal = galactose, Glc = glucose; ^b Porcentagem obtida da dosagem colorimétrica (Filisetti-Cozzi e Carpita, 1991), corrigida em relação a dosagem de carboidratos totais (Dubois *et al.*, 1956).

7.4.4 Espectroscopia de RMN das frações F e F3

As frações F e F3 foram submetidas à espectroscopia de RMN de ¹³C (FIGURA 24). Os espectros destas frações indicaram a semelhança estrutural entre elas. No entanto, na fração F3 destacam-se sinais de maior intensidade em 101,1; 74,7; 73,0; 72,7 e 62,1 ppm, que foram atribuídos, respectivamente, aos C1, C3, C2, C5 e C6 de α-D-glucose 1,4-ligada, proveniente do amido de reserva das algas verdes (Gorin, 1981; Colson *et al.*, 1974). Este resultado corrobora com a composição monossacarídica (TABELA 10) e o perfil heterogêneo de HPSEC-MALLS-RI para a fração F3 (FIGURA 25, página 102). Os deslocamentos em 18,1-18,3 e 63,7 ppm, corresponderam, respectivamente, ao grupo metil das unidades de α-L-ramnose e ao C5 das unidades de β-D-xilose (Lahaye, 1998).

Os deslocamentos químicos presentes no espectro de RMN de ¹³C da fração F (FIGURA 24) indicaram a presença das díades de →4)-β-D-Glc α -(1→4)-α-L-Rhap 3S-(1 e →4)-β-D-Xyl α -(1→4)-α-L-Rhap 3S-(1 como componentes majoritários da ulvana extraída de *U. fasciata* (Lahaye *et al.*, 1997).

FIGURA 24 - ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES F E F3 OBTIDAS DE *U. fasciata*

Espectro de RMN de ^{13}C das frações F (a) e F3 (b). Solvente: D_2O , 70 °C; Acetona como padrão interno (31,45 ppm)

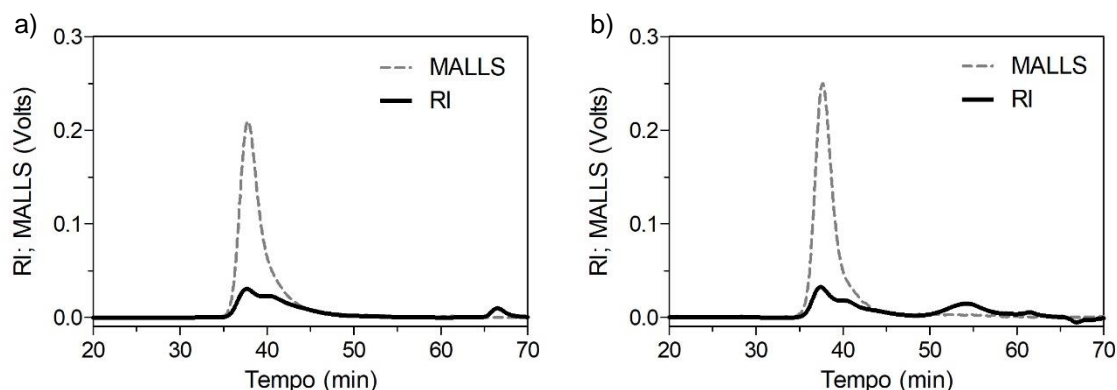
7.4.5 Análise de HPSEC-MALLS-RI das frações F e F3

Os perfis de eluição em cromatografia de HPSEC-MALLS-RI das frações F e F3 das ulvanas extraídas de *U. fasciata* são apresentados na FIGURA 25. Os perfis cromatográficos detectados por RI foram semelhantes para as duas frações, no entanto, o cromatograma da fração F3 apresentou polissacarídeos de menor massa molar (55 min) (FIGURA 25).

Bryhni (1978) demonstrou que os polissacarídeos da alga *Ulva mutabilis* isolados por extração aquosa, realizada a 100 °C por 30 minutos, apresentaram teores de glucose na faixa de 15% (relativo ao total de monossacarídeos presentes nos extratos) e foram atribuídos ao amido de reserva das algas verdes.

Portanto, a sequência de três extrações aquosas a 80 °C, da alga *U. fasciata* no presente trabalho, promoveu a extração de polissacarídeos de reserva na terceira extração, o que corrobora com a alta porcentagem de glucose encontrada na composição monossacarídica da fração F3 (TABELA 10).

FIGURA 25 - CROMATOGRAMAS DE HPSEC-MALLS-RI DAS FRAÇÕES F E F3 OBTIDAS DE *U. fasciata*



Cromatogramas de HPSEC-MALLS-RI com o detector MALLS (90°) e índice de refração (RI) plotados em relação ao tempo de retenção (min). Frações a) F e b) F3. FONTE: O autor (2017).

As frações F e F3 apresentaram o mesmo perfil de detecção por MALLS (90°), os quais coincidem com o pico principal detectado por RI (~37,5 min), o qual também mostra ombros a partir de 40 minutos de cromatografia. Estes perfis condizem com os obtidos em estudos de diferentes algas do gênero *Ulva*, os quais mostraram ulvanas geralmente compostas por dois picos alargados (RI), sugerindo duas populações de macromoléculas ou ainda a alta tendência de agregação entre as ulvanas (Robic *et al.*, 2008; Paradossi *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2012).

A fração F apresentou dispersão de 1,6 (referente a relação entre $M_w/M_n = 558.300 \text{ g.mol}^{-1} / 349.900 \text{ g.mol}^{-1}$, estimados por HPSEC-MALLS-RI). Esta ulvana apresentou menor dispersão quando comparada às carragenanas discutidas no item 7.3.3 (página 94) ou ainda aos polímeros lineares comerciais utilizados na área biomédica, os quais apresentam valores de dispersão entre 2 e 3 (Cooper *et al.*, 2004).

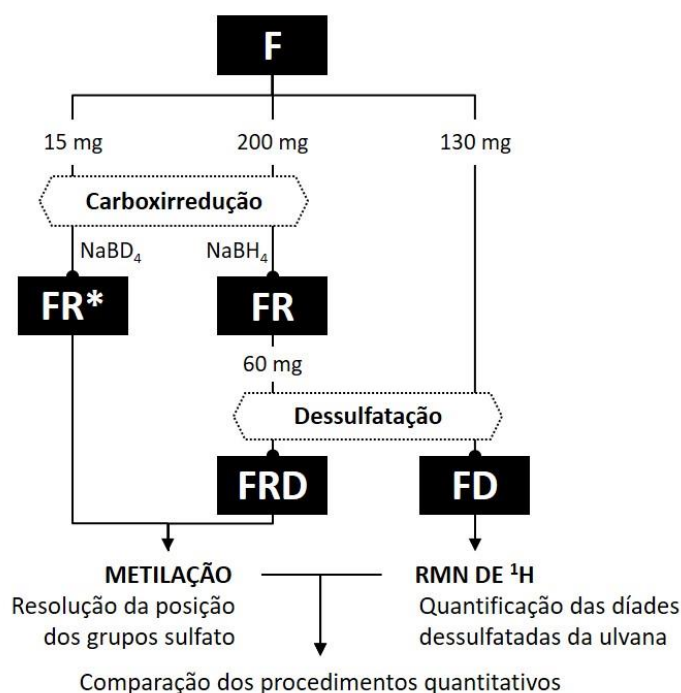
A massa molar ponderal média (M_w) relativa da fração F foi estimada em $211.755 \text{ g.mol}^{-1}$, a partir da equação $y = -0,0301x + 6,4597$ ($R^2 = 0,970$) (TABELA 2, página 66) (Colodi, 2011). Este valor de massa está de acordo com os encontrados para ulvanas obtidas de diferentes espécies de *Ulva* sp. As ulvanas apresentam amplas variações de M_w , sendo as variações atribuídas aos fenômenos de agregação entre polieletrólitos constituídos por ulvanas (Costa *et al.*, 2012).

7.4.6 Determinação da estrutura química fina da ulvana obtida de *U. fasciata*

Tendo em vista que as ulvanas são polissacarídeos sulfatados e que contêm ácidos urônicos, requerem processos de: (1) carboxirredução do polímero nativo, seguido de permetilação; (2) carboxirredução do polímero nativo seguido de dessulfatação e permetilação. A análise comparativa entre os produtos de metilação do polímero nativo e dessulfatado permitiram determinar a posição dos grupos sulfato bem como o tipo de ligações glicosídicas do polímero original.

Assim, diferentes porções da ulvana F foram submetidas a dessulfatação e a carboxirredução em presença de NaBH_4 ou NaBD_4 , originando as frações FD, FR e FR^* , respectivamente. A dessulfatação da fração carboxirreduzida FR originou a fração FRD. A análise de metilação foi realizada com as frações FR^* e FRD, para resolver o posicionamento dos grupos sulfato. A fração dessulfatada FD foi utilizada para comprovar as proporções de díades de ulvana encontradas pelas análises de metilação (FIGURA 26).

FIGURA 26 - ESQUEMA DA DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA FINA DA ULVANA F OBTIDA DA ALGA VERDE *Ulva fasciata*



FONTE: O autor (2017).

7.4.6.1 Carboxirredução e dessulfatação da ulvana F de *U. fasciata*

A fração F foi submetida à carboxirredução em presença de NaBH₄ ou NaBD₄, originando as frações FR e FR*, respectivamente. A análise da fração FR*, carboxirreduzida e marcada com deutério, permitiu identificar e quantificar os ácidos urônicos presentes na ulvana obtida de *U. fasciata*.

No processo de carboxirredução, os ácidos urônicos presentes no polissacarídeo nativo são convertidos em seus respectivos monossacarídeos neutros, de forma que o ácido glucurônico produz glucose e o ácido idurônico produz idose. Os monossacarídeos neutros originados pela redução com NaBD₄ apresentam duas unidades de massa a mais em C6 quando comparados aos monossacarídeos neutros originais do polímero. Desta forma, os perfis de fragmentação gerados por CG-EM mostraram íons específicos para os monossacarídeos originalmente neutros e ácidos, sendo o íon 217, indicativo de hexoses presentes no polímero original e o íon 219, de hexoses provenientes de ácidos urônicos no polímero original.

O processo de carboxirredução também melhora a recuperação de monossacarídeos neutros após hidrólise. Na ausência dos monossacarídeos ácidos as ligações glicosídicas não são mais estabilizadas pelas forças indutivas das carboxilas e deixam de ser resistentes à hidrólise (BeMiller, 1967).

A dessulfatação foi conduzida para as frações nativa F e carboxirreduzida FR, originando as frações dessulfatadas FD e FRD.

Polissacarídeos dessulfatados originaram espectros de RMN com menor grau de complexidade quando comparados aos espectros do polímero sulfatado. Assim, a integração dos hidrogênios do espectro de RMN de ¹H da fração dessulfatada FD permitiu quantificar as díades dessulfatadas constituintes da ulvana F.

As frações carboxirreduzidas FR* e dessulfatada FRD foram submetidas a etapas de metilação com o intuito de analisar os tipos de ligação e o posicionamento dos grupos sulfato da ulvana F.

Os resultados de metilação foram comparados com os dados quantitativos obtidos da integração do espectro de RMN de ¹H da fração FD para corroborar a análise química por duas estratégias diferentes de quantificação das díades constituintes da ulvana obtida da alga verde *U. fasciata*.

A recuperação e as análises químicas das frações carboxirreduzidas (frações FR e FR*) e carboxirreduzidas com sequencial dessulfatação (frações FD e FRD) são apresentadas na TABELA 11.

Os ácidos urônicos presentes na fração F foram carboxirreduzidos em alta porcentagem (aproximadamente 88%), de forma que a fração carboxirreduzida FR apresentou apenas 2,5% de ácidos urônicos. As porcentagens de dessulfatação foram de 71,7 e 90,5% para FD e FRD, respectivamente.

TABELA 11 - RECUPERAÇÃO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES F, FD, FR, FRD E FR* OBTIDAS DE *U. fasciata*

Frações	Recuperação ^a (%)	Carboidrato ^b (%)	Sulfato ^c (%)	Urônicos ^d (%)
F ^e	-	72,4	21,2	21,9
FD	77,0	70,2	6,0	19,9
FR	78,0	58,3	21,0	2,5
FRD	50,0	n.d.	2,0	n.d.
FR*	94,0	77,3	23,0	2,7

n.d. = não determinado; ^a Recuperação em relação a massa de material submetido dessulfatação (130 mg para FD, 60 mg para FRD) e a carboxirredução (200 mg para FR e 15 mg para FR*); ^{b, c, d} Determinações de acordo com os métodos de Dubois *et al.* (1956), Dodgson e Price (1962) e Filisetti-Cozzi e Carpita (1991), respectivamente; ^e Fração incluída para fins comparativos.

A composição monossacarídica das frações F, FD, FR, FRD e FR* está apresentada na TABELA 12. As frações não carboxirreduzidas F e FD apresentaram a composição monossacarídica ajustada em relação as dosagens colorimétricas de carboidratos totais e ácidos urônicos.

Durante o processo de carboxirredução o ácido idurônico é convertido ao monossacarídeo neutro idose. No processo de derivatização das amostras para análise em CG-EM a idose livre entra em equilíbrio com a forma cíclica 1,6-anidro-idose em função da condição ácida utilizada durante a hidrólise dos monossacarídeos. Após redução e acetilação dos monossacarídeos, a 1,6-anidro-idose é quantificada na forma de 2,3,4-tri-O-acetil-1,6-anidro-hexose por CG-EM, sendo identificada pelos íons 69, 81, 98, 115, 126, 144, 157, 186 e 229 *m/z*. No entanto, em meio ácido o equilíbrio se estabelece quando 86% das unidades monossacarídicas de idose encontram-se ciclizadas (Collins e Ferrier, 1995). Desta forma, as áreas dos cromatogramas do CG-EM correspondentes ao derivado 2,3,4-tri-O-acetil-1,6-anidro-

hexose (mol%), foram ajustadas, considerando o equilíbrio em meio ácido, para 100% de idose, resultando nos valores apresentados na TABELA 12.

As frações carboxirreduzidas FR e dessulfatada FRD foram carboxirreduzidas em presença de NaBH₄ e, portanto, não permitiram diferenciar ácido glucurônico de glucose, mas mostraram a presença de idose na composição monossacarídica (TABELA 12), a qual foi proveniente do ácido idurônico presente na ulvana original e foi identificada pelo derivado 2,3,4-tri-O-acetil-1,6-anidro-hexose (69, 81, 98, 115, 126, 144, 157, 186 e 229 *m/z*), tendo sido considerando o equilíbrio em meio ácido entre idose e 2,3,4-tri-O-acetil-1,6-anidro-hexose para o ajuste das áreas dos cromatogramas do CG-EM.

Assim, apenas a fração FR* carboxirreduzida utilizando NaBD₄ como agente redutor permitiu identificar e quantificar tanto ácido idurônico quanto ácido glucurônico, no polímero original (TABELA 12).

TABELA 12 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES F, FD, FR, FRD E FR* OBTIDAS DE *U. fasciata*

Frações	Composição monossacarídica (mol%)						
	Rha ^a	Xyl	GlcA ^b	Ido(A) ^c	Gal	3Gal	Glc
F ^{d, e}	49,0	13,2		30,2	0,7	1,3	5,6
FD ^d	42,8	17,2		28,4	1,6	3,4	6,7
FR	42,9	19,5	n.d.	7,5	1,8	2,8	25,5
FRD	46,7	22,4	n.d.	5,3	1,3	2,2	22,1
FR*	50,2	16,7	17,9	7,5	1,7	2,8	3,2

n.d. = não determinado; ^a Rha = ramnose, Xyl = xilose, GlcA = ácido glucurônico, Ido(A) = idose ou ácido idurônico, Gal = galactose, 3Gal = 3-O-Me-galactose, Glc = glucose; ^b As frações FR e FRD, carboxirreduzidas com NaBH₄, não apresentaram ácidos urônicos, pois após a carboxirredução estes são convertidos em seus respectivos monossacarídeos neutros. Assim o conteúdo original de ácido glucurônico foi contabilizado juntamente com a glucose (Glc, 25,5 e 22,1 mol%, respectivamente), enquanto o ácido idurônico original pôde ser identificado como o monossacarídeo neutro idose (Ido, 7,5 e 5,3 mol%, respectivamente, para FR e FRD). A fração FR*, carboxirreduzida com NaBD₄, também não apresentou ácidos urônicos, sendo as porcentagens mostradas na tabela referentes a quantificação do íon 219 *m/z*. A quantificação dos ácidos urônicos, presentes no polissacarídeo antes da carboxirredução, hidrólise e redução com deutério (NaBD₄), pôde ser realizada pela presença do íon específico 219 *m/z*, que ao apresentar duas unidades de massa a mais em C6, apontou 17,9 e 7,5 mol% de ácidos glucurônico e idurônico, respectivamente. ^c Ácido idurônico determinado pela presença de idose, considerando o equilíbrio em meio ácido entre idose e 2,3,4-tri-O-acetil-1,6-anidro-hexose para as frações FR e FRD e ácido idurônico para a fração FR*; ^d Composições monossacarídicas ajustadas com relação às dosagens colorimétricas de açúcar total e ácidos urônicos; ^e Fração incluída para fins comparativos.

As composições monossacarídicas apresentadas na TABELA 12, sofreram algumas variações em função do tratamento dos dados e por conta dos processos utilizados na obtenção de cada fração. No entanto, levando em consideração o caso particular das diferenças entre os monossacarídeos ácidos, todas as frações apresentaram a mesma proporção entre os monossacarídeos constituintes, demonstrando que os processos de carboxirredução e dessulfatação não ocasionaram degradação significativa do polímero.

A análise comparativa da composição monossacarídica das frações F e FR demonstrou o aumento no conteúdo de glucose (5,6→25,5 mol%). Este aumento referiu-se ao teor de ácido glucurônico na ulvana nativa e foi condizente com o conteúdo de ácido urônico determinado para a fração FR* (17,9 mol%). Os fragmentos de massa obtidos pela análise por CG-EM para a fração FR* mostraram que o derivado glucitol hexaacetato apresentou íons com m/z 217 e 219, os quais referiram-se a presença de glucose e ácido glucurônico, respectivamente. As unidades de glucitol hexaacetato para FR* compreenderam 21,1 mol%, assim a partir das intensidades dos íons 217 e 219 determinaram-se as porcentagens de glucose e ácido glucurônico como 3,2 e 17,9 mol%, respectivamente (TABELA 12).

As frações carboxirreduzidas FR* e dessulfatada FRD foram submetidas ao processo de metilação para determinar os tipos de ligações glicosídicas e o posicionamento dos grupos sulfato na ulvana original.

7.4.6.2 Análise de metilação da ulvana F de *U. fasciata*

As análises de metilação das frações FR* e FRD foram conduzidas através do método de Ciucanu e Kerek (1984) utilizando iodometano (ICH_3). Com o objetivo de evitar a degradação do polímero em meio básico e melhorar sua solubilidade no solvente da metilação, as ulvanas foram tratadas com NaBH_4 e solução de trietilamina (5 g%), respectivamente (Stevenson e Furneaux, 1991). Os polissacarídeos na forma de sal de trietilamônio, solúveis em DMSO, foram submetidos a três etapas de metilação, hidrolisados, reduzidos, acetilados e analisados por CG-EM.

Os produtos de hidrólise consistiram em diversos tipos de derivados metilados e refletem a complexidade estrutural da ulvana (TABELA 13, página 109). A fração FR* apresentou 2-Me-Rha, 2,3-Me₂-Xyl e 2,3,6-Me₃-Glc como derivados metilados majoritários, totalizando 67,4 mol%. Ainda foram identificados 7,0 mol% de unidades

de 2,3,6-Me₃-Ido e 6,7 mol% de α -L-ramnose (Rha) não metilada, a qual apresentou proporção constante mesmo após as três etapas de metilação, indicando a presença de unidades de ramnose 2,3,4-trissubstituídas. Estes derivados metilados somaram, aproximadamente 80 mol%, constituindo a cadeia principal da ulvana.

As unidades de ácido glucurônico reduzidas a glucose, pelo processo de carboxirredução, foram identificadas como 2,3,4,6-Me₄-Glc e 2,3,6-Me₃-Glc, enquanto as unidades 2,3,4,6-Me₄-Ido e 2,3,6-Me₃-Ido corresponderam às unidades de ácido idurônico carboxirreduzidas a idose. A soma destas unidades ácidas condiz com o teor de ácidos urônicos encontrado pela dosagem colorimétrica da ulvana nativa (TABELA 11).

As unidades trimetiladas 2,3,4-Me₃-Rha (1,5 mol%) e 2,3,4-Me₃-Xyl (0,6 mol%) e tetrametiladas 2,3,4,6-Me₄-Glc (1,6 mol%) e 2,3,4,6-Me₄-Ido (0,9 mol%) representam os terminais não redutores (TNR). Adicionalmente, foram identificados 2,0 e 4,8 mol% de unidades de 2,4-Me₂-Rha e 3-Me-Xyl, respectivamente.

O processo de dessulfatação solvolítica foi conduzido com a fração FR (21,0% de sulfato) originando a fração dessulfatada FRD (2,0% de sulfato), a qual também foi metilada. A análise comparativa das porcentagens e tipos de derivados parcialmente metilados de ambas as frações permitiu determinar o posicionamento dos grupos sulfato no polímero original, conforme mostra a discussão a seguir.

A fração FRD foi obtida por carboxirredução na presença de NaBH₄, assim o conteúdo de ácido idurônico na fração original foi determinada pela presença do derivado idose, entre os produtos de metilação analisados por CG-EM, considerando o equilíbrio em meio ácido entre idose e 1,5-di-O-acetil-(1,6,6-trideutério)-2,3,4,6-O-metil-idositol. Em relação às unidades de ácido glucurônico estas foram contabilizadas com o derivado 2,3,6-Me₃-Glc, que também se refere às unidades de glucose, oriundas da contaminação por amido, polissacarídeo de reserva das algas verdes. Neste caso, ao descontar os 3,0 mol% de glucose contaminante (quantificada na fração FR*) dos 21,0 mol% de unidades 2,3,6-Me₃-Glc encontradas para a fração dessulfatada FRD, tem-se a mesma proporção de unidades de ácido glucurônico quantificadas para FR*.

A ausência de derivados que sugerem outros tipos de substituição, além das substituições nas posições 1 e 4 (derivados 2,3,6-Me₃-Glc), indicou que não havia substituições por sulfato nas unidades de ácido glucurônico da ulvana nativa.

Os derivados 2,3,4,6-Me₄-Ido e 2,3,6-Me₃-Ido permaneceram na mesma proporção, antes e depois da dessulfatação, demonstrando que não havia unidades sulfatadas de ácido idurônico na fração nativa.

TABELA 13 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DA ULVANA OBTIDA DE *U. fasciata*: FRAÇÕES CARBOXIRREDUZIDA COM NaBD₄ (FR*) E CARBOXIRREDUZIDA COM NaBH₄ E DESSULFATADA (FRD)

Derivado ^a	Unidade correspondente	Frações	
		FR*	FRD
2,3,4-Me ₃ -Rha ^b	Rha TNR	1,5	3,6
2,4-Me ₂ -Rha	Rha TNR 3S	2,0	-
2,3-Me ₂ -Rha	Rha 4L	-	36,2
2-Me-Rha	Rha 4L3S/4L3R	39,4	3,9
3-Me-Rha	Rha 4L2R	-	6,0
Rha	Rha 4L3S2R	6,7	-
2,3,4-Me ₃ -Xyl	Xyl TNR	0,6	0,5
2,3-Me ₂ -Xyl	Xyl 4L	12,3	17,5
3-Me-Xyl	Xyl 4L2S	4,8	-
2,3,4,6-Me ₄ -Glc ^c	GlcA TNR	1,6	-
2,3,6-Me ₃ -Glc	GlcA 4L	15,7	-
2,3,4,6-Me ₄ -Ido	IdoA TNR	0,9	0,7
2,3,6-Me ₃ -Ido	IdoA 4L	7,0	6,1
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	Glc TNR	-	-
2,3,6-Me ₃ -Glc	Glc 4L	3,0	21,0 ^d
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	Gal TNR	2,0	2,0
2,3,6-Me ₃ -Gal ^e	Gal 4L	2,5	2,5

- = não detectado; TNR = terminal não redutor; ^a mol% dos monossacarídeos quantificados na forma de alditóis acetato parcialmente metilados; ^b 2,3,4-Me₃-Rha analisada como 1,5-di-O-acetil-2,3,4-O-metilramnitol, etc.; ^c derivados carboxirreduzidos analisados como 2,3,4,6-Me₄-GlcA = 1,5-di-O-acetil-(1,6,6-trideutério)-2,3,4,6-O-metil-glucitol e 2,3,4,6-Me₄-IdoA = 1,5-di-O-acetil-(1,6,6-trideutério)-2,3,4,6-O-metil-idositol, etc.; ^d Corresponde a soma de glucose e ácido glucurônico; ^e Corresponde a unidades de 3-O-metil-D-galactose naturalmente metiladas.

Após a dessulfatação, o principal derivado metilado foi 2,3-Me₂-Rha (36,2 mol%) que se refere a unidades de α -L-ramnose 4-substituídas as quais não estavam presentes na fração original FR*. Concomitante ao aparecimento do derivado 2,3-Me₂-Rha houve a diminuição do derivado 2-Me-Rha, o qual foi atribuído às unidades de α -L-ramnose 3,4-dissubstituídas. Assim, concluiu-se que 36,2 mol% das unidades de α -L-ramnose do polissacarídeo nativo eram constituídas por unidades de α -L-ramnose 4-ligada substituída por sulfato em C3. A fração dessulfatada ainda conservou 3,9 mol% de unidades de α -L-ramnose 3,4-dissubstituídas (derivado 2-Me-Rha), que foram atribuídas a unidades de α -L-ramnose 4-ligada ramificada em C3.

Concomitantemente ao desaparecimento do derivado não metilado de Rha, a fração dessulfatada apresentou o aparecimento de 3-Me-Rha (6,0 mol%), indicando que 6,0 mol% da ulvana nativa é composta por unidades de α -L-ramnose 4-ligada sulfatada em C3 e substituída em C2.

A substituição por ácido β -D-glucurônico em C2 das unidades de α -L-ramnose 3-sulfato está presente na ulvana extraída da alga verde *Ulva rigida* e foi descrita por meio de estudos de RMN de ¹H e ¹³C dos oligossacarídeos obtidos por hidrólise ácida (Lahaye e Ray, 1996).

O desaparecimento do derivado 2,4-Me₂-Rha para a fração dessulfatada FRD em conjunto com o aumento do derivado 2,3,4-Me₃-Rha (1,5→3,6 mol%) mostrou que os terminais não redutores (TNR) de α -L-ramnose são sulfatados em C3 numa proporção de 2,0 mol%.

Dentre os derivados metilados de xilose para a fração dessulfatada FRD, observou-se o desaparecimento de 3-Me-Xyl e o concomitante aumento de 2,3-Me₂-Xyl (12,3→17,5 mol%), indicando que 4,8 mol% das unidades de β -D-xilose são substituídas por sulfato em C2.

Assim, unidades de ramnose, xilose e ácido glucurônico e ácido idurônico (totalizando aproximadamente 80 mol%) constituem a cadeia principal da ulvana F obtida de *U. fasciata*. Os derivados de ramnose 4-ligada totalizaram aproximadamente 40 mol% da mesma forma que a soma dos derivados 4-ligados de xilose, ácido glucurônico e idurônico. Esta relação demonstrou que a cadeia principal da ulvana é constituída por monossacarídeos 4-ligados, que podem ser distribuídos de maneira a compor as díades propostas por Lahaye (1998), nas proporções demonstradas na TABELA 14.

TABELA 14 - PROPORÇÕES DAS DÍADES PRESENTES NA ULVANA DE *U. fasciata*

Díade ^a	Monossacarídeos constituintes	Proporção ^b (mol%)	Porcentagem ^c (%)
A _{3S}	→4)-β-D-Glc _p A-(1→4)-α-L-Rhap 3-sulfato-(1	15,7	39,3
B _{3S}	→4)-α-L-IdopA-(1→4)-α-L-Rhap 3-sulfato-(1	7,0	17,5
U _{3S}	→4)-β-D-Xyl _p -(1→4)-α-L-Rhap 3-sulfato-(1	12,3	30,8
U _{2',3S}	→4)-β-D-Xyl _p 2-sulfato-(1→4)-α-L-Rhap 3-sulfato-(1	4,8	12,0

^a A_{3S}: Ulvanobiurônico 3-sulfato tipo A; B_{3S}: Ulvanobiurônico 3-sulfato tipo B; U_{3S}: Ulvanobiose 3-sulfato; U_{2',3S}: Ulvanobiose 2',3-dissulfato; ^b Proporção de díades (em mol%) contidas na ulvana, conforme os dados obtidos da metilação (TABELA 13); ^c Porcentagem de díades ajustada para 100%.

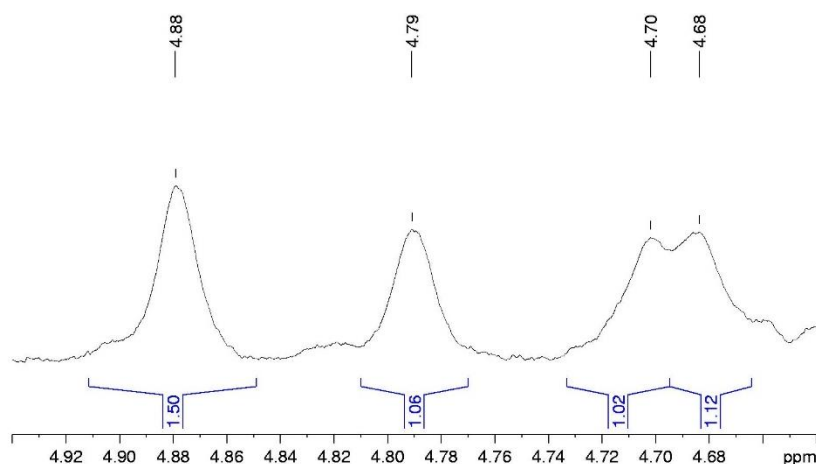
Estas proporções da distribuição das díades no polímero foram corroboradas pela integração dos hidrogênios da região anomérica do espectro de RMN de ¹H da fração dessulfatada FRD (FIGURA 27).

O sinal em 4,88 ppm refere-se aos hidrogênios das unidades de α-L-ramnose ligadas a β-D-xilose e ácido α-L-idurônico, os quais se sobrepõem e integraram para 1,50. Os hidrogênios das unidades de α-L-ramnose ligadas ao ácido β-D-glucurônico foram atribuídos ao sinal em 4,79 ppm e integraram para 1,06. Aos hidrogênios das unidades de β-D-xilose (I 1,02) e ácido β-D-glucurônico (I 1,12) foram atribuídos os sinais em 4,70 e 4,68 ppm, respectivamente (FIGURA 27).

No polímero original, conforme a TABELA 14, a soma das porcentagens das díades de xilose U_{3S} e U_{2',3S} e ácido idurônico B_{3S} correspondeu a 60,3% do total de díades, enquanto as díades de ácido glucurônico A_{3S} somaram 39,3%.

A integral da área referente ao sinal em 4,88 ppm da fração dessulfatada mostrou a soma dos hidrogênios de α-L-ramnose das díades U_{3S}, U_{2',3S} e B_{3S}. Assim, a relação entre as díades, obtidas por RMN de ¹H, devem corresponder a relação em mol% obtida dos dados de metilação. Assim, tem-se a relação (U_{3S} + U_{2',3S} + B_{3S}) / A_{3S}, que resulta em 1,4 pela integração dos hidrogênios e 1,5 pela quantificação em mol% obtida da metilação, corroborando os dados quantitativos de RMN com a metilação.

FIGURA 27 - INTEGRAÇÕES DA REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO DESSULFATADA FRD OBTIDA DE *U. fasciata*



Solvente D_2O , 70 °C; padrão interno acetona (2,225 ppm). FONTE: O autor (2017).

O conteúdo total de unidades de β -D-xilose, a partir dos dados de metilação, somou 17,7 mol%, enquanto o conteúdo total de ácido β -D-glucurônico somou 17,3 mol%. A relação das integrações de hidrogênio para as áreas correspondentes a estes monossacarídeos é aproximadamente 1,0, equivalente a encontrada pelos dados de metilação.

Após os processos de carboxirredução e dessulfatação da ulvana de *U. fasciata*, a análise da fração FRD permitiu mostrar que os derivados metilados majoritários foram 2,3-Me₂-Rha, 2,3-Me₂-Xyl, 2,3,6-Me₃-Ido e 2,3,6-Me₃-Glc, correspondentes aos monossacarídeos constituintes das díades da cadeia principal.

Os derivados 2-Me-Rha (3,9 mol%) e 3-Me-Rha (6,0 mol%) corresponderam as unidades de α -L-ramnose 4-ligada, 3-substituída e α -L-ramnose 4-ligada 2-substituída, respectivamente. Estas ramificações (9,9 mol%) foram condizentes com a soma dos terminais não redutores encontrados na fração FR*: α -L-ramnose (1,5 mol%), α -L-ramnose 3-sulfato (2,0 mol%), β -D-xilose (0,6 mol%), ácido β -D-glucurônico (1,6 mol%), ácido α -L-idurônico (0,9 mol%) e D-galactose (2,0 mol%), bem como da fração FRD considerando adicionalmente a porcentagem de ácido glucurônico como terminais não redutores determinado na análise de metilação da fração FR*.

As unidades de galactose 1,4-ligadas (2,5 mol%) foram contabilizadas como ramificações em conjunto com a D-galactose (2,0 mol%). Desta forma a ulvana apresentaria dissacarídeos de galactose como ramificações. A composição

monossacarídica da ulvana F mostra a presença de 3-O-metil-D-galactose, portanto os derivados 2,3,6-Me₃-Gal foram atribuídos a este tipo de unidade monossacarídica. Estas atribuições são fundamentadas nas observações descritas a seguir.

A participação de monossacarídeos neutros, do tipo manose e galactose, como constituintes das ulvanas é desconsiderada em função do isolamento de uma fração polissacarídica neutra diferente do polímero ácido encontrado para *U. mutabilis* (Bryhni, 1978). No entanto, o extrato aquoso em oxalato de sódio obtido de *U. rigida* mostrou a presença de pequenas porcentagens tanto de 3/4-O-metil-hexose quanto de D-galactose, sendo o primeiro presente na fração neutra e o segundo em frações carregadas, isoladas por cromatografia em DEAE-Sephadex CL-6B em concentrações entre 0,05 a 1,0 mol.L⁻¹ de NaCl (Ray e Lahaye, 1995a). Adicionalmente, estudos com polissacarídeos ácidos, extraídos com oxalato de sódio aquoso, isolados de diversas espécies de algas verdes da classe Charophyceae, as representantes mais próximas das plantas terrestres, mostraram a presença de 3-O-metil-D-galactose (O'Rourke *et al.*, 2015).

Desta forma, o presente trabalho apresentou resultados que sugerem a participação das unidades de D-galactose e seu derivado naturalmente metilado 3-O-metil-D-galactose como parte da estrutura da ulvana na forma de glicosilações da cadeia principal.

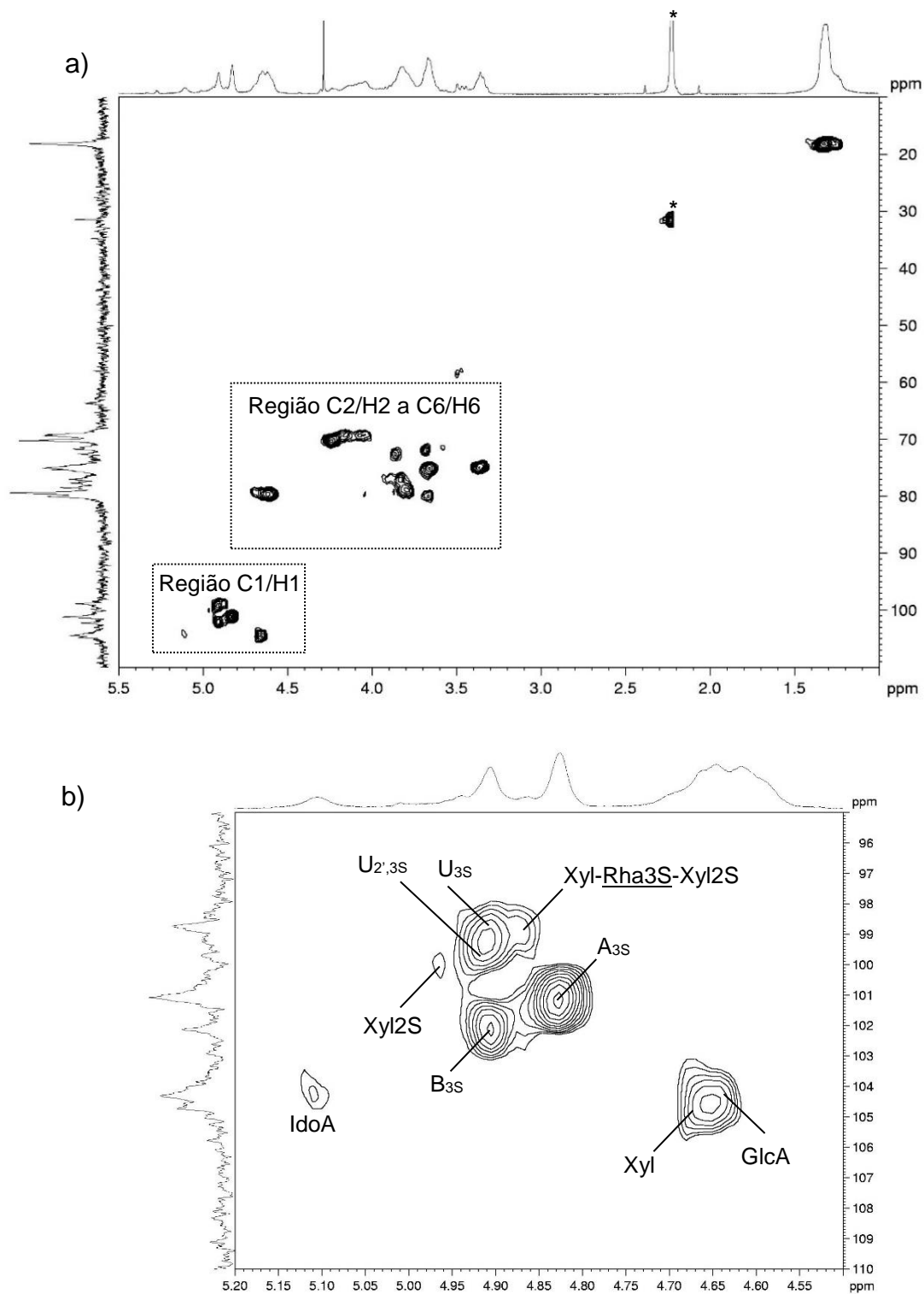
7.4.7 Espectroscopia de RMN da ulvana F de *U. fasciata*

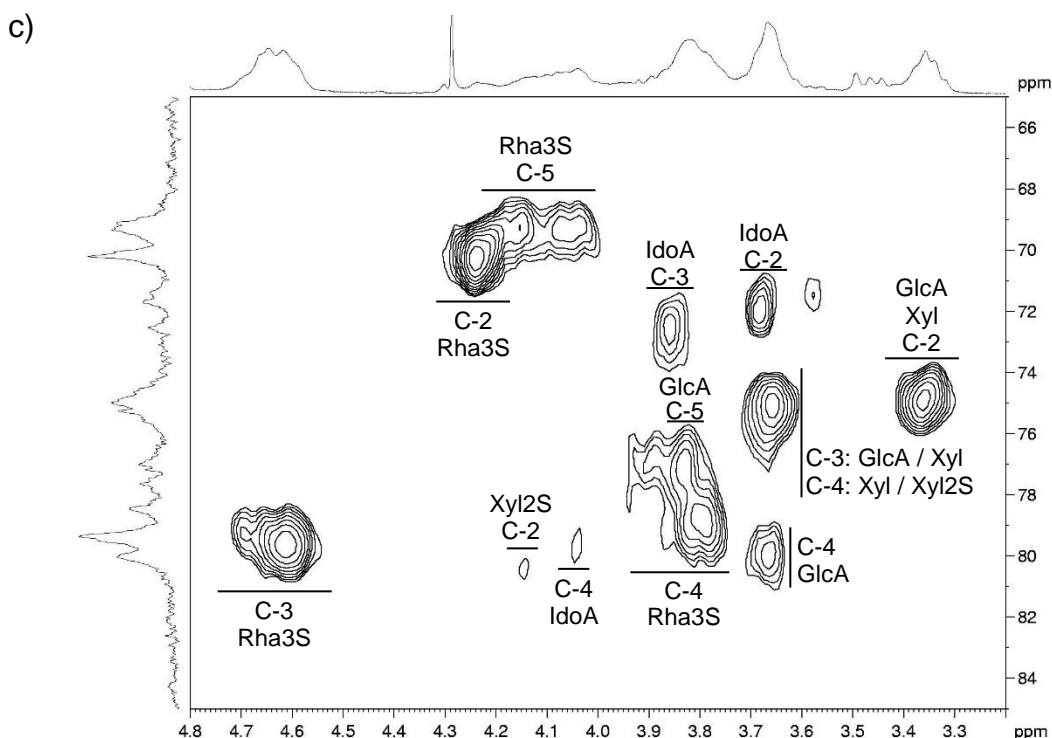
A fração F foi analisada por RMN de ¹H e ¹³C e pelos espectros bidimensionais de COSY e HSQC. Os espectros foram calibrados utilizando a acetona como padrão interno (31,45 e 2,225 ppm). No espectro completo de HSQC da fração F (FIGURA 28), destaca-se a correlação em 18,1/~1,32 ppm, referente aos grupos metil (-CH₃) das unidades de α-L-ramnose (3-sulfato) (Lahaye *et al.*, 1997; Lahaye, 1998; Lahaye *et al.*, 1998). O inserto do espectro de HSQC da fração F referente a região anomérica é apresentado na FIGURA 28b. Os assinalamentos da fração F são apresentados na TABELA 15 (Lahaye, 1998; Lahaye *et al.*, 1997; Lahaye *et al.*, 1998).

Os carbonos e hidrogênios de todas as díades constituintes da ulvana F foram assinalados, exceto a correlação de C5/H5 das unidades de ácido α-L-idurônico, a qual não foi detectada no espectro de HSQC da fração F. Adicionalmente, as unidades

de α -L-ramnose 3-sulfato intercaladas entre unidades de β -D-xilose e β -D-xilose 2-sulfato também puderam ser identificadas (TABELA 15).

FIGURA 28 - ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO F OBTIDA DA ALGA *U. fasciata*





a) Espectro de HSQC da fração polissacarídica F obtida da alga verde *U. fasciata*; b) inserto do espectro de HSQC da fração F referente a região anomérica (C1/H1); c) inserto do espectro de HSQC da fração F referente a região de C2/H2 a C6/H6. Solvente D₂O, 70 °C; padrão interno acetona (31,45 e 2,225 ppm) (*). FONTE: O autor (2017).

A região anomérica do espectro de HSQC da fração F mostrou em 102,0-98,0/4,9-4,8 ppm as correlações referentes às unidades de α -L-ramnose 3-sulfato componentes das quatro díades da ulvana: A_{3S}, β -D-GlcpA em 104,3/4,64 ppm ligada a α -L-Rhap 3-sulfato em 101,1/4,83 ppm; U_{3S}, β -D-Xylp em 104,7/4,64 ppm ligada a α -L-Rhap 3-sulfato em 98,7/4,91 ppm; B_{3S}, α -L-IdopA em 104,3/5,11 ppm ligada a α -L-Rhap 3-sulfato em 102,1/4,91 ppm e U_{2',3S}, β -D-Xylp 2-sulfato em 100,0/4,96 ppm ligada a α -L-Rhap 3-sulfato em 99,3/4,91 ppm (FIGURA 28b) (Lahaye *et al.*, 1997; Lahaye, 1998; Lahaye *et al.*, 1998).

Adicionalmente, a região anomérica do espectro de HSQC da fração F mostra a correlação em 98,9/4,86 ppm atribuída às unidades de α -L-ramnose 3-sulfato vizinhas a β -D-xilose e β -D-xilose 2-sulfato (Xyl-Rha3S-Xyl2S) (FIGURA 28b) (Lahaye, 1998).

TABELA 15 - ASSINALAMENTOS DAS DÍADES CONSTITUINTES DA ULVANA F OBTIDA DE *U. fasciata* DE ACORDO COM AS ANÁLISES DE RMN DE ^1H , ^{13}C , HSQC e COSY

Díade ^a	Monossacarídeos constituintes	C1 H1	C2 H2	C3 H3	C4 H4	C5 H5,5'	C6 H6
A _{3S}	4)-β-D-GlcpA-(1→	104,3	75,0	75,3	80,0	77,0	175,3
		4,64	3,36	3,67	3,67	3,82	
	→4)-α-L-Rhap 3S-(1	101,1	70,2	79,4	79,4	69,3	18,1
		4,83	4,24	4,62	3,77	4,14	~1,32
U _{3S}	4)-β-D-Xylp-(1→	104,7	75,0	75,3	75,3	63,7	
		4,64	3,36	3,67	3,67	3,38/4,10 ^b	
	→4)-α-L-Rhap 3S-(1	98,7	70,2	79,4	78,5	69,3	18,1
		4,91	4,24	4,64	3,78	4,04	~1,32
B _{3S}	4)-β-D-IdopA-(1→	104,3	71,7	72,5	79,7	-	174,7
		5,11	3,67	3,85	4,04	-	
	→4)-α-L-Rhap 3S-(1	102,1	70,2	79,4	79,4	69,6	18,1
		4,91	4,24	4,69	3,77	3,99	~1,32
U _{2',3S}	4)-β-D-Xylp 2S-(1→	100,0	80,4	72,5	75,3	63,1	
		4,96	4,14	3,85	3,67	3,40/4,13 ^b	
	→4)-α-L-Rhap 3S-(1	99,3	70,2	79,4	78,5	69,3	18,1
		4,91	4,24	4,64	3,82	4,06	~1,32
4)-β-D-Xyl 2S-(1→		98,9	69,5	79,4	77,0	68,9	18,1
4)-α-L-Rhap 3S-(1 ^c		4,86	4,23	4,69	3,89	4,05	~1,32
→4)-β-D-Xyl							

^a A_{3S}: Ulvanobiurônico 3-sulfato tipo A (Lahaye *et al.*, 1997); U_{3S}: Ulvanobiose 3-sulfato (Lahaye, 1998); B_{3S}: Ulvanobiurônico 3-sulfato tipo B; U_{2',3S} (Lahaye *et al.*, 1998): Ulvanobiose 2',3-dissulfato (Lahaye, 1998); ^b Correlações de intensidades fracas, visíveis já próximas ao ruído; ^c Correlações referentes a unidades de α-L-ramnose 3-sulfato intercaladas entre unidades de β-D-xilose e β-D-xilose 2-sulfato (Lahaye, 1998).

No espectro de HSQC da fração F (região de C2/H2 a C6/H6) (FIGURA 28c) destacam-se as correlações na região de 79,4/4,56-4,70 ppm, referem-se aos C3 das unidades de α-L-ramnose 3-sulfato, os quais não estão presentes no espectro da fração dessulfatada FD (espectro não mostrado) (Lahaye *et al.*, 1997; Lahaye, 1998; Lahaye *et al.*, 1998).

A região de correlações entre 70,5-68,0/4,30-4,00 ppm concentra os sinais de C2 e C5 de α -L-ramnose 3-sulfato (Rha3S), enquanto a região entre 80,5-75,5/3,90-3,75 ppm contempla as correlações de C4 de α -L-ramnose 3-sulfato e C5 de ácido β -D-glucurônico. Os C4 e C3 das unidades de ácido β -D-glucurônico e β -D-xilose (2-sulfato) foram atribuídos à região de 77,0-74,0/3,70-3,60 ppm. Os assinalamentos de cada unidade monossacarídica que compõe as díades da ulvana F estão apresentados na TABELA 15 (Lahaye *et al.*, 1997; Lahaye, 1998; Lahaye *et al.*, 1998).

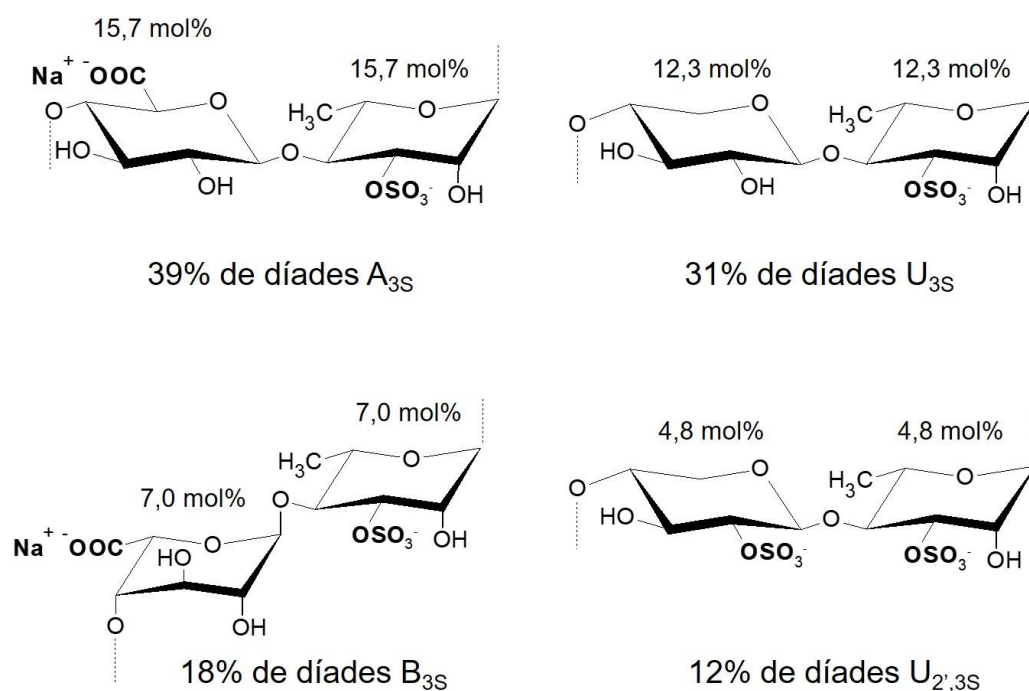
Tendo em vista o que foi exposto pelos dados de espectroscopia de RMN da ulvana F, os mesmos condizem com a análise de metilação e conclui-se que ambas as abordagens contribuíram para a determinação estrutural, de maneira a corroborar os dados encontrados em cada tipo de análise.

A análise estrutural da ulvana obtida da alga verde *Ulva fasciata* permitiu identificar e quantificar as díades constituintes majoritárias deste polímero natural, conforme mostra a FIGURA 29.

A caracterização estrutural da ulvana obtida da alga verde *U. fasciata* possibilitou mapear as estruturas-alvo para as modificações da ulvana, as quais são constituídas por ácidos carboxílicos em aproximadamente 23 mol% (15,7 e 7,0 mol% de ácidos β -D-glucurônico e α -L-idurônico, respectivamente) e 35 mol% de monossacarídeos que apresentam carbonos C2 e C3 substituídos por hidroxilas vicinais (15,7; 7,0 e 12,3 mol% de ácidos β -D-glucurônico e α -L-idurônico e β -D-xilose, respectivamente) (FIGURA 29). Desta forma, a inserção de grupos amina nas ulvanas foi realizada utilizando diaminas, por meio de duas estratégias diferentes (FIGURA 8):

(1) amidação dos monossacarídeos ácidos β -D-glucurônico e α -L-idurônico com 1,3-diaminopropano (DAP) e 1,6-diaminoexano (HMD) e, ainda, com a monoamina *n*-pentilamina (Am);

(2) oxidação de C2 e C3 das unidades de β -D-xilose e ácidos β -D-glucurônico e α -L-idurônico com *m*-periodato de sódio seguida de aminação redutiva com as diaminas 1,3-diaminopropano (DAP) e 1,6-diaminoexano (HMD).

FIGURA 29 - ESTRUTURA QUÍMICA DA ULVANA OBTIDA DA ALGA VERDE *U. fasciata*

As principais díades constituintes da ulvana obtida de *U. fasciata*. As díades A_{3S}, B_{3S}, U_{3S} e U_{2,3S} representam, respectivamente, 39, 18, 31 e 12% do polissacarídeo, compondo 79,6 mol% do mesmo. As unidades monossacarídicas ácidas →4)-β-D-GlcpA-(1 e →4)-α-L-IdopA-(1 somam 22,7 mol% desta ulvana, enquanto as unidades oxidáveis com *m*-periodato de sódio →4)-β-D-GlcpA-(1; →4)-α-L-IdopA-(1 e →4)-β-D-Xylp-(1 totalizam 35 mol%. Unidades de →4)-α-L-Rhap 3 e 2-substituídas-(1 somam aproximadamente 10 mol%, unidades monossacarídicas nas quais estão inseridos os pontos de ramificação, compostos por terminais não redutores de α-L-Rhap (1,5 mol%), α-L-Rhap 3-sulfato (2,0 mol%), β-D-Xylp (0,6 mol%), β-D-GlcpA (1,6 mol%), α-L-IdopA (0,9 mol%) e dissacarídeos →4)-α-D-Gal 3-O-Me(1→4)-α-D-Gal (2,0 mol%) (ver TABELA 13, página 109). FONTE: O autor (2017).

O item 7.5 (página 119) trata da otimização das reações de amidação dos ácidos urônicos, enquanto o item 7.7 (página 141) aborda a otimização da reação de aminação redutiva utilizada para a semissíntese de polissacarídeos híbridos através da inserção da fração dissacarídica Kb, obtida da *kappa*-carragenana, nas ulvanas-amida funcionalizadas com as diaminas 1,3-diaminopropano e 1,6-diaminoexano.

O item 7.9 (página 157) traz as condições da reação sequencial de oxidação-aminação redutiva da ulvana. A semissíntese de polissacarídeos híbridos por meio da inserção da fração dissacarídica Kb, obtida da *kappa*-carragenana, nas ulvanas-amina funcionalizadas com as diaminas 1,3-diaminopropano (DAP) e 1,6-diaminoexano (HMD) é abordada no item 7.11 (página 172). Adicionalmente, através de métodos químicos e espectroscópicos, também é discutida a caracterização química das modificações químicas realizadas nas ulvanas.

7.5 PROCESSO DE OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO DE AMIDAÇÃO DA ULVANA OBTIDA DE *U. fasciata*

Os ácidos urônicos presentes na ulvana constituem os alvos da modificação química via amidação. Assim, a modificação dos grupos carboxílicos baseou-se na reação de amidação através da ativação das carboxilas via carbodiimida (Nakajima e Ikada, 1995; Bulpitt e Aeschlimann, 1999; Danishefsky e Siskovic, 1971).

Diferentes tipos de carbodiimida podem ser utilizadas para ativar carboxilas, no entanto a *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC) é mais utilizada em função de sua solubilidade em água (Schanté *et al.*, 2011a).

Reações de amidação ocorrem em uma larga faixa de pH (4,0-8,0), visto que podem ser utilizadas reações em pH 4,0 para hidrogéis de acrilamida (Nakajima e Ikada, 1995), em pH 7,5 para ácido hialurônico (Schanté *et al.*, 2011b) e em pH 8,0 para ácidos poliglucurônicos semissintéticos, resultantes da oxidação da celulose (Follain *et al.*, 2008).

Condições levemente ácidas são necessárias para promover a ionização inicial da carbodiimida, no entanto existem poucos sistemas tampão que não levam ácidos carboxílicos em sua composição (Mojarradi, 2010). Tampões compostos por ácidos carboxílicos, como acetato e citrato, podem produzir anidridos mistos com os reagentes e formar produtos indesejados e subprodutos (Sehgal e Vijay, 1994).

A amidação do ácido hialurônico utilizando EDC, *N*-hidroxisuccinimida (NHS) e o aminoácido alanina foi conduzida em meio aquoso a temperatura ambiente por 12 h (Schanté *et al.*, 2011b). Destaca-se que as diaminas 1,3-diaminopropano e 1,6-diaminoexano, selecionadas para amidação da ulvana obtida no presente trabalho, apresentaram pH entre 10 a 11 quando adicionadas ao meio reacional.

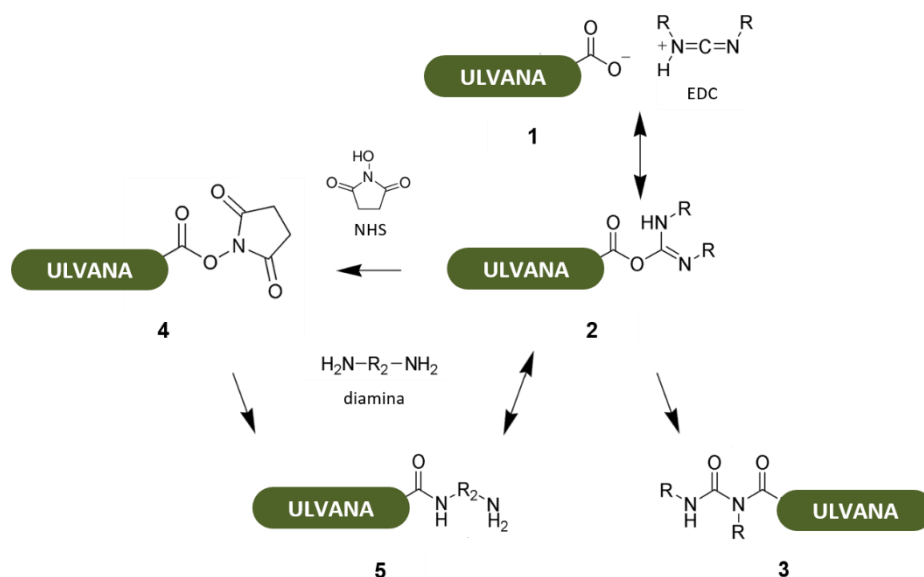
Assim, com o intuito de evitar grandes variações de pH no momento da adição das diaminas, a amidação das ulvanas foi realizada em meio tamponado, de forma que as reações foram conduzidas em tampão ácido 2-(*N*-morfolino)-etanosulfônico (MES, pK_a 6,15) 0,2 mol.L⁻¹. Ainda, para garantir a manutenção da temperatura, as reações foram conduzidas em banho termostaticado à 30 °C, tendo sido mantidas por 3 h. A recuperação da ulvana foi realizada por meio de diálise da mistura reacional (MWCO 6-8 KDa).

7.5.1 Otimização da reação de amidação

De forma geral, nas reações de amidação, o grupamento ácido carboxílico (**1**) pode ser ativado pela *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilcarbodiimida (EDC) e formar o intermediário instável *O*-acilisourea (**2**), o qual pode sofrer rearranjo e formar o subproduto estável *N*-acilureia (**3**) ou, por meio do ataque nucleofílico de uma amina ou diamina, formar a ligação amida (**5**) (Khorana, 1953) (FIGURA 30).

A adição de *N*-hidroxisuccinimida (NHS) ou 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) às reações de amidação, realizadas com EDC, previnem a formação do subproduto *N*-acilureia (Bulpitt e Aeschlimann, 1999). A adição de NHS permite a formação do intermediário succinimidil éster (**4**), composto por um bom grupo retirante e mais estável que a *O*-acilisourea (FIGURA 30).

FIGURA 30 - ESQUEMA DO MECANISMO DE AMIDAÇÃO DA ULVANA VIA CARBODIIMIDA UTILIZANDO *N*-HIDROXISUCCINIMIDA (NHS)



Fonte: O autor (2016).

A modificação química das ulvanas por adição de grupos amino através da amidação não teve o objetivo de promover a amidação total dos ácidos urônicos, tendo em vista que as carboxilas também constituem grupos interessantes para atividades biológicas.

A TABELA 16 mostra as condições empregadas para a otimização da reação de amidação da ulvana. As reações analíticas foram conduzidas com 50 mg de ulvana, utilizando 1,3-diaminopropano e avaliaram a influência do pH, bem como dos equivalentes de EDC e NHS na formação da ligação amida.

As condições de amidação (TABELA 16) foram analisadas com auxílio dos dados de RMN de ^1H , através da integração dos sinais em 3,05 ppm, referente, aos hidrogênios H3' do substituinte *N*-(3'-aminopropil)-amida (FIGURA 35, página 127) e aos hidrogênios metilênicos do intermediário *O*-acilisoureia em 2,91 ppm (FIGURA 32 e FIGURA 33, página 123).

Na entrada 1 (TABELA 16), a reação foi realizada em pH 6,00, na presença de 20 meq. de diamina e 10 meq. de EDC, em relação aos grupos carboxílicos presentes na ulvana. Nestas condições, foi identificada apenas a formação do intermediário *O*-acilisoureia e do subproduto *N*-acilureia.

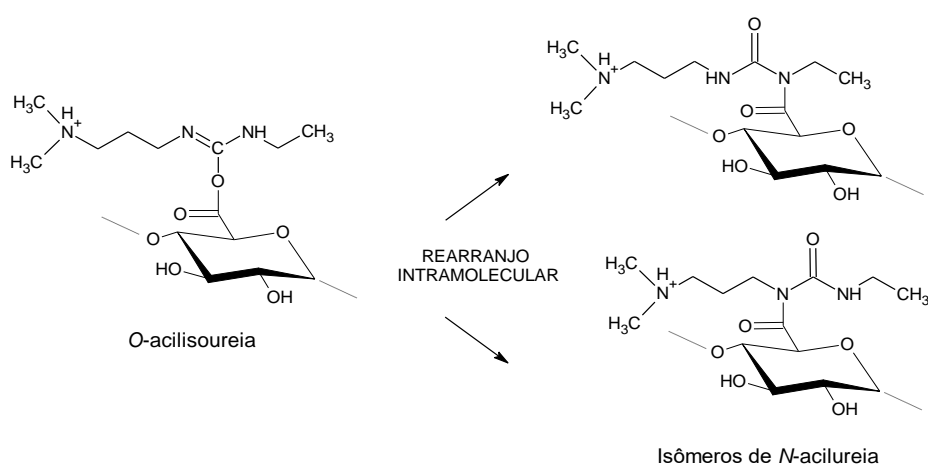
TABELA 16 - OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS PARA MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA ULVANA VIA AMIDAÇÃO

Entrada	pH	EDC (meq.)	NHS (meq.)	Produto amida 3,05 ppm ^a	Intermediário <i>O</i> -acilisoureia 2,91 ppm ^a	Relação $\int 3,05 / \int 2,91$
1	6,00	10	-	0	0,41	0
2	6,00	4	-	0	0,41	0
3 ^b	6,00	4	3	0,19 ^c	0,06	3,2
4	6,00	4	3	0,13	0,06	2,2
5	6,00	1	1	0,07	0,03	2,3
6	5,40	4	3	0,13	0,07	1,8
7	4,27	4	3	0,27	0,06	4,5
8	4,27	4	5	0,43	0,03	14,3
9	4,27	4	10	0,14	0,01	14,0
10	4,75	4	5	0,78	0,04	19,5
11 ^d	4,75	4	5	0,18	0,01	18,0
12	4,75	7	3	0,35	0,07	5,0

Relação entre a intensidade das integrações dos sinais em 3,05 e 2,91 ppm que representam o produto amida e o intermediário *O*-acilisoureia nos espectros de RMN de ^1H . ^a Intensidades de integração relativas a região de H3 de α -L-ramnose 4,56-4,69 ppm com integração = 1. As integrações foram realizadas pelos espectros de RMN de ^1H ; ^b Reação realizada com a *n*-pentilamina; ^c Integração relativa ao sinal em 3,20 ppm da *n*-pentilamina, referente ao H1' do grupo *N*-(pentil)-amida; ^d Adição da 1,3-diaminopropano depois da adição de EDC e NHS.

Inoue e Nagasawa (1982) e Kuo e colaboradores (1991) descreveram a formação do intermediário *O*-acilisoureia e do subproduto *N*-acilureia após realizar modificações químicas via EDC em condroitin 6-sulfato, heparina ou ácido hialurônico. Os autores apresentaram dados de RMN de ^1H e mostraram que há diferença entre os hidrogênios dos grupos $-\text{CH}_3$ da extremidade *N*-etil da EDC na *N*-acilureia (1,09 ppm) e na *O*-acilisoureia (1,19 ppm). Além disso, o subproduto *N*-acilureia pode assumir duas formas isômeras (FIGURA 31).

FIGURA 31 - INTERMEDIÁRIO *O*-ACILISUREIA E SUBPRODUTO *N*-ACILUREIA



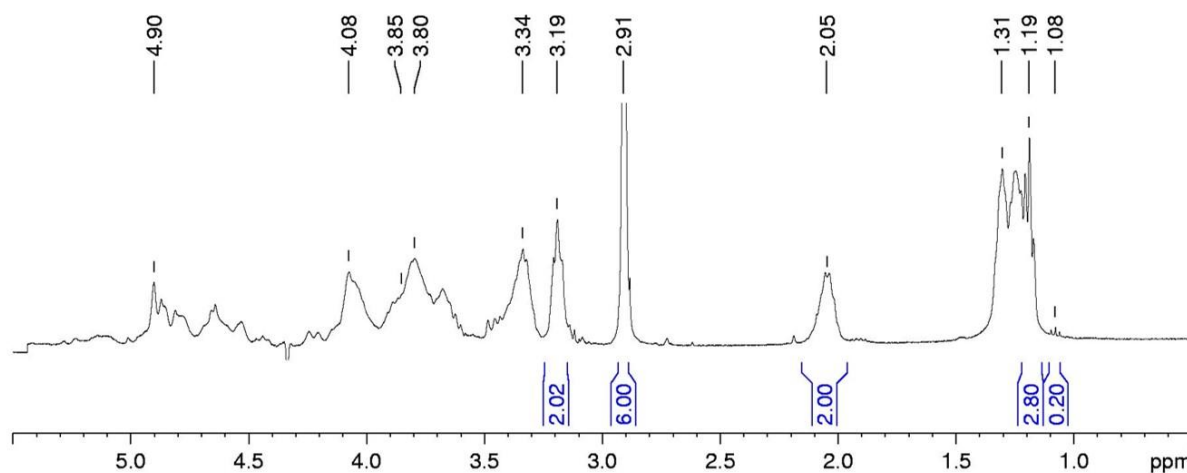
Fonte: O autor (2017).

O-Acilisourea é descrito como um intermediário reativo, que ao reagir com a amina pode gerar o produto desejado ou sofrer rearranjo intramolecular e formar uma *N*-acilureia como subproduto. Geralmente, este subproduto é formado na ausência da amina ou em condições levemente básicas (Schanté *et al.*, 2001a, Inoue e Nagasawa, 1982 e Kuo *et al.*, 1991).

No espectro de RMN de ^1H do produto da primeira reação de amidação empregando a ulvana F, EDC, 1,3-diaminopropano em tampão MES pH 6,0 (produto da entrada 1, TABELA 16) mostrado na FIGURA 32, foi observado um sinal intenso em 2,91 ppm, referente aos hidrogênios dos grupos *N*-metil da *O*-acilisourea. Adicionalmente, o sinal centrado em 2,05 ppm foi atribuído aos hidrogênios metilênicos centrais da cadeia propil pertencente ao grupo *N*-(3-dimetilaminopropil) do intermediário *O*-acilisourea (Inoue e Nagasawa, 1982; Kuo *et al.*, 1991). As integrações do espectro de hidrogênio confirmaram as proporções entre os grupos *N*-metil (6H) e o grupo metil (3H) da extremidade *N*-etil, bem como os hidrogênios

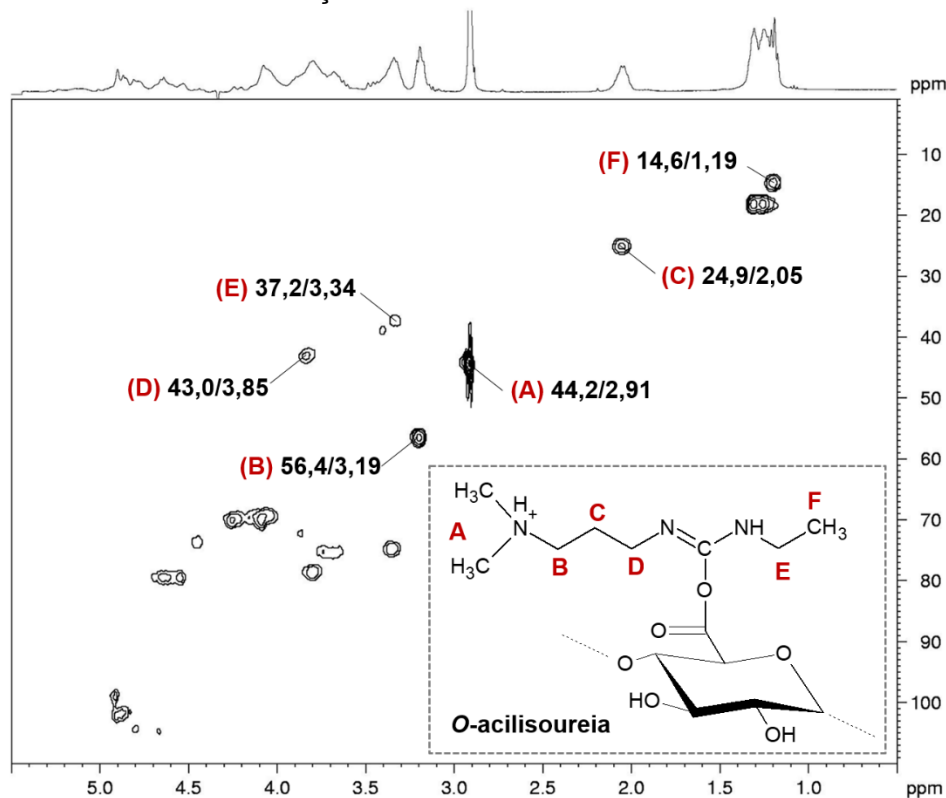
metilênicos (2H) assinalados em 3,19 e 2,05 ppm (ver estrutura representada no espectro de HSQC, FIGURA 33).

FIGURA 32 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO PRODUTO DA REAÇÃO DE AMIDAÇÃO COM EDC: INTERMEDIÁRIO O-ACILISOUREIA E SUBPRODUTO N-ACILUREIA



Espectro de RMN de ^1H resultante do produto da reação de otimização (entrada 1, TABELA 16). Solvente: D_2O , 70 °C; padrão interno acetona (31,45 e 2,225 ppm). Fonte: O autor (2017).

FIGURA 33 - ESPECTRO DE HSQC MOSTRANDO O INTERMEDIÁRIO DA REAÇÃO DE AMIDAÇÃO COM EDC: O-ACILISOUREIA



Espectro de HSQC resultante do produto da reação de amidação (entrada 1, TABELA 16). Solvente: D_2O , 70 °C; padrão interno acetona (31,45 e 2,225 ppm). Fonte: O autor (2017).

Ainda, no espectro de RMN de ^1H do produto da primeira reação de amidação (FIGURA 32) foi observado, em 1,08 ppm, um triplete referente aos hidrogênios metílicos ($-\text{CH}_3$) da extremidade *N*-etil da *N*-acilureia, indicando a formação do subproduto de rearranjo com EDC (Inoue e Nagasawa, 1982 e Kuo *et al.*, 1991). A integração dos sinais 1,19 (3H) e 1,08 (3H) ppm sugeriu uma proporção de 14:1 entre *O*-acilisoureia e *N*-acilureia, respectivamente.

Adicionalmente, com auxílio dos espectros de HBMC (espectro não mostrado) e HSQC foram assinalados os outros carbonos e hidrogênios do intermediário *O*-acilisoureia. No espectro de HSQC (FIGURA 33) são mostradas as correlações do intermediário *O*-acilisoureia.

A formação do subproduto *N*-acilureia é favorecida quando a reação de amidação se utiliza de um excesso de carbodiimida em relação aos grupos carboxila (Swaisgood e Natake, 1973; Nakajima e Ikada, 1995).

A partir desta observação e do resultado da reação da entrada 1, na entrada 2 foram utilizados 2,5 vezes menos EDC. No entanto, em ambas as reações, conduzidas com 10 meq. ou 4 meq. de EDC, respectivamente, apenas intermediário *O*-acilisoureia e, provavelmente uma pequena quantidade de subproduto *N*-acilureia foram obtidos, pois apenas o sinal em 2,91 ppm foi encontrado nos espectros de RMN de ^1H dos produtos das entradas 1 e 2, como mostra a TABELA 16. A caracterização do intermediário *O*-acilisoureia formado foi realizada de acordo com Inoue e Nagasawa (1982) e Kuo *et al.* (1991) (FIGURA 33).

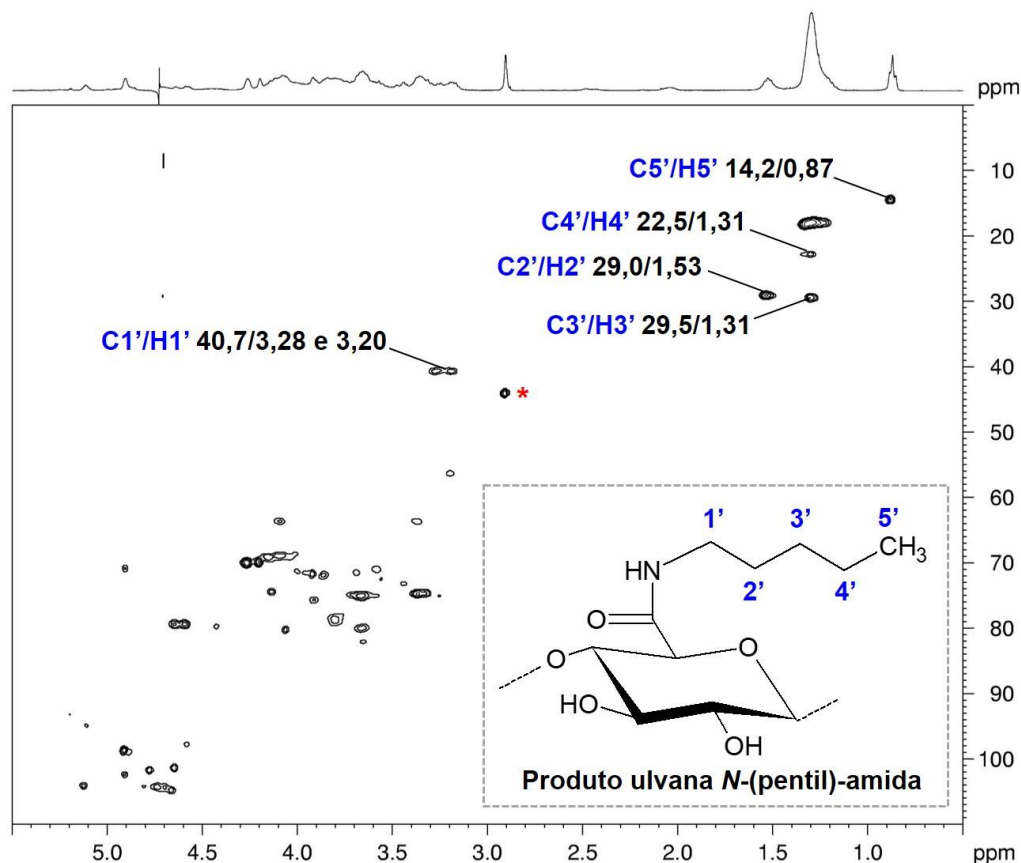
Tendo em vista a formação do intermediário *O*-acilisoureia e subproduto *N*-acilureia nas primeiras condições de amidação (entradas 1 e 2, TABELA 16) e o possível mascaramento dos sinais do produto amida desejado, foi conduzida a reação de amidação com a *n*-pentilamina. A identificação deste produto amida foi facilitada pela presença do grupo $-\text{CH}_3$ e pela cadeia carbônica com cinco carbonos, os quais apresentaram sinais e correlações distantes das encontradas para a ulvana.

Durante as reações de amidação, além da possibilidade da formação do intermediário *O*-acilisoureia e do subproduto *N*-acilureia, o ataque nucleofílico que origina o produto amida resulta da competição entre água e amina. Desta forma, *N*-hidroxisuccinimida (NHS) pode ser adicionada ao meio reacional com o intuito de promover a formação de um intermediário succinimidil éster, composto por um bom grupo retirante e mais estável que a *O*-acilisoureia. Assim, os grupos ativados pela

NHS são capazes de reagir com aminas, formar amidas e liberar NHS (FIGURA 30) (Staros *et al.*, 1986; Sehgal e Vijay, 1994; Bulpitt e Aeschlimann, 1999).

Assim, com o intuito de diminuir a formação de intermediário e fomentar a produção da amida, NHS foi adicionada às reações de amidação na presença da *n*-pentilamina. Na TABELA 16, a entrada 3 mostra as condições da reação de amidação com a *n*-pentilamina na presença de NHS (3 meq.) e EDC (4 meq.). A partir desta reação pôde-se caracterizar a presença do produto *N*-(pentil)-amida e do intermediário *O*-acilisourea (entrada 3, TABELA 16, FIGURA 34).

FIGURA 34 - ESPECTRO DE HSQC DO PRODUTO DA REAÇÃO COM *n*-PENTILAMINA EM PRESENÇA DE EDC E NHS



Espectro de HSQC resultante do produto da reação de otimização (entrada 3, TABELA 16). O símbolo * assinala *O*-acilisourea. Solvente: D₂O, 70 °C; padrão interno acetona (31,45 e 2,225 ppm). Fonte: O autor (2017).

A reação de amidação com a *n*-pentilamina (entrada 3, TABELA 16) foi conduzida na presença de *N*-hidroxisuccinimida (NHS) e o produto da reação foi caracterizado por RMN de ¹H, HMBC (espectros não mostrados) e HSQC. O espectro de HSQC resultante do produto desta reação mostrou algumas correlações referentes

a *O*-acilisoureira, mas também mostrou as correlações da *N*-(pentil)-amida em 40,7/3,28,3,20 ppm, como mostra o espectro da FIGURA 34, sugerindo que a *n*-pentilamina foi ligada aos grupos carboxílicos da ulvana.

Tendo em vista a formação de produto *N*-(pentil)-amida nas condições de amidação da entrada 3, a mesma condição de reação foi utilizada para amidação com a 1,3-diaminopropano (entrada 4, TABELA 16). As análises de HSQC do produto da reação da entrada 4 (FIGURA 35) possibilitaram identificar a formação do produto *N*-(3'-aminopropil)-amida e avaliar as condições reacionais com maiores rendimentos em amida, a partir da integração dos sinais em 3,05 ppm, referente ao produto amida e em 2,91 ppm, referente ao intermediário *O*-acilisoureira (TABELA 16).

O sinal em 3,05 ppm foi atribuído aos hidrogênios ligados ao C3' do grupo *N*-(3'-aminopropil)-amida. Este sinal difere dos assinalados para a diamina com ambas as extremidades livres, 3,15 ou 3,11 ppm, dependendo do pH, os quais estão apresentados na TABELA 17 e foram determinados através de experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C (espectros não mostrados) da 1,3-diaminopropano livre, em condições de pH 7,0 e pH 11.

TABELA 17 - ASSINALAMENTOS DO 1,3-DIAMINOPROPANO OBTIDOS POR ESPECTROSCOPIA DE RMN (^1H E HSQC) EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE pH

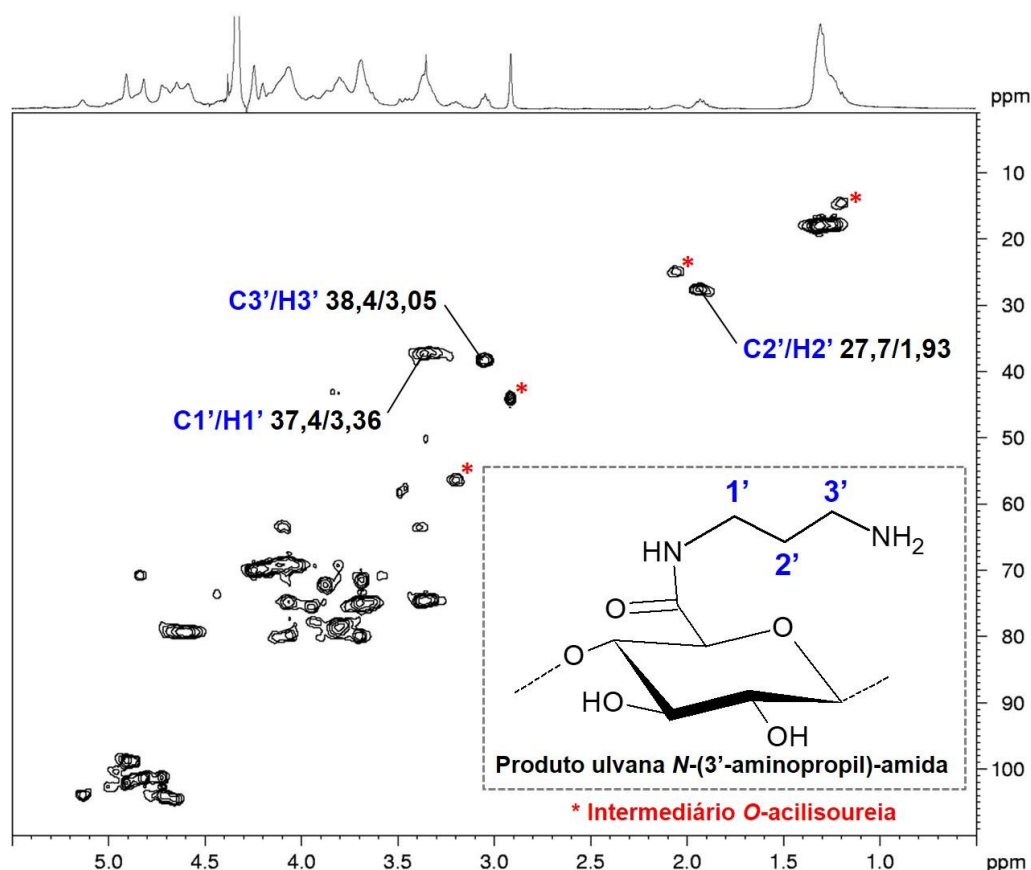
Estrutura	Assinalamentos (ppm)			
	pH 7		pH 11	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
– CH₂ CH ₂ CH₂ –	3,15 (<i>J</i> 7,67)	37,6	3,11 (<i>J</i> 7,62)	38,5
–CH ₂ CH₂ CH ₂ –	2,10 (<i>J</i> 7,67)	25,5	2,06 (<i>J</i> 7,87)	35,2

Os espectros de RMN de ^1H e HSCQ do produto da entrada 4 (TABELA 16) apresentaram correlações referentes a *O*-acilisoureira, mas permitiram identificar uma correlação nova em 3,05/38,4 ppm. Assim, com auxílio dos experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C da 1,3-diaminopropano livre (TABELA 17), o produto ulvana-amida foi identificado pela correlação em 3,05/38,4 ppm, a qual foi atribuída a C3'/H3' do grupo *N*-(3'-aminopropil)-amida (FIGURA 35).

Os espectros de COSY e HMBC (espectros não mostrados) da reação de amidação (entrada 4, TABELA 16) mostraram as correlações homonucleares em 1,93/3,05 e 1,93/3,36 ppm, e heteronucleares em 1,93/38,4, 1,93/37,4, 3,05/27,7, 3,05/37,4 e 3,36/27,7 ppm, as quais sugerem a presença do produto amida. Ao

metileno (C1'/H1') do grupo *N*-(3'-aminopropil)-amida foi atribuída a correlação em 3,36/37,4 ppm, enquanto o grupo -CH₂- central da cadeia (C2'/H2') foi identificado pela correlação em 1,93/27,7 ppm, como mostra o espectro de HSQC (FIGURA 35). Os assinalamentos de C1'/H1' e C3'/H3' estão de acordo com a literatura (Follain *et al.*, 2008; Bulpitt e Aeschlimann, 1999).

FIGURA 35 - ESPECTRO DE HSQC DO PRODUTO DA REAÇÃO UTILIZANDO 1,3-DIAMINOPROPANO EM PRESENÇA DE EDC E NHS



Espectro de HSQC resultante do produto da reação da entrada 4 (TABELA 16). O símbolo * assinala o intermediário *O*-acilisourea; Solvente: D₂O, 70 °C; padrão interno acetona (31,45 e 2,225 ppm). Fonte: O autor (2017).

Visando verificar o resultado da amidação em baixos equivalentes de EDC e NHS para reduzir o consumo de reagentes, a reação da entrada 5 foi realizada com 1 meq. de EDC e de NHS. Nesta condição houve pouca conversão ao produto, como mostra o resultado da integração, correspondente a 0,07 (TABELA 16).

Assim, destaca-se que a amidação da ulvana parece depender do uso de NHS e, portanto, formação do intermediário succinimidil éster. Tendo em vista que altos equivalentes de EDC não formaram produto (entrada 1, TABELA 16), e que baixos equivalentes de EDC, mesmo em presença de NHS (entrada 5, TABELA 16), levaram

a baixas conversões em produto, o valor de EDC foi fixado em 4 meq., enquanto o pH do meio reacional e os equivalentes de NHS foram alterados.

As reações de amidação são muito sensíveis em função da dependência do pH, destacando-se que o pH ótimo para cada etapa é diferente. A ativação da carboxila pela EDC ocorre mais facilmente em meio ácido (pH 3,5 - 4,5) (Nakajima e Ikada, 1995), no entanto, decorrente da desprotonação da amina, a formação de amida ocorre de forma mais apropriada em pH mais alto. Adicionalmente, como demonstrado pelas reações das entradas 1 e 2 (TABELA 16), realizadas em pH 6, condições mais básicas podem desviar a formação de amida para a formação de *O*-acilisoureira e *N*-acilureia.

O meio reacional levemente ácido promove a protonação inicial da carbodiimida EDC levando a ativação dos grupos carboxila (Kurzer e Douraghi-Zadeh, 1967). Assim, ao comparar a formação de produto em diferentes valores de pH (entradas 4, 6 e 7, TABELA 16) destaca-se que a reação de amidação da ulvana ocorreu de forma mais efetiva em pH ácido (pH 4,27, entrada 7, TABELA 16).

Além da variação do pH do meio reacional, diferentes proporções de EDC e NHS também foram avaliadas. Ao comparar as entradas 7, 8 e 9 (TABELA 16), todas realizadas em pH 4,27, nota-se que o aumento de NHS em relação a EDC reduz a formação do intermediário *O*-acilisoureira (0,06, 0,03 e 0,01 para os miliequivalentes de NHS iguais a 3, 5 e 10, respectivamente). Adicionalmente, ao comparar as entradas 8 e 9, verifica-se que ao dobrar os equivalentes de NHS (entrada 9), o rendimento de amida em relação aos intermediários permanece igual, numa relação de 14:1.

Desta forma, a entrada 8, mostrou a melhor condição de conversão das carboxilas da ulvana em produto amida, por apresentar maior recuperação de produto e baixa formação de intermediário, como mostram, respectivamente, as integrações de produto amida e *O*-acilisoureira de 0,43 e 0,03 na TABELA 16.

Adicionalmente, ainda foram testadas mais três condições reacionais em pH 4,75 (entradas 10, 11 e 12, TABELA 16). Apesar da faixa de pH ótimo que indica maior reatividade da EDC em relação aos grupos carboxílicos ter sido determinada entre 3,5 e 4,5 (Nakajima e Ikada, 1995), o pH de 4,75 reflete o pKa das carboxilas, condição de equilíbrio entre as carboxilas protonadas e não protonadas.

Assim, para comparar com a melhor condição de amidação da ulvana (entrada 8), a reação da entrada 10 foi realizada nas mesmas condições da entrada 8 (TABELA 16). Observou-se que o produto da entrada 10 formou, praticamente, o

dobro de amida obtida na entrada 8, indicando que o pH 4,75 melhorou a reatividade das carboxilas e aumentou a taxa de amidação.

Para comparar diferentes sequências reacionais, as mesmas condições das entradas 8 e 10 foram utilizadas na reação de amidação que consistiu na adição da 1,3-diaminopropano após a adição de EDC e NHS. Esta ordem de adição dos reagentes segue a ordem realizada para a carboxirredução dos polissacarídeos (Taylor e Conrad, 1972). O resultado desta reação foi expresso pela entrada 11, demonstrando que a ordem de adição da diamina parece diminuir o rendimento do produto amida apesar de não influenciar a relação produto/intermediário (TABELA 16).

Na entrada 12 (TABELA 16) foi testada a condição de amidação com 7 meq. de EDC para 3 meq. de NHS. O resultado desta reação mostrou que a reação de amidação da ulvana obteve menores rendimentos quando foi adicionada mais EDC do que NHS. Este resultado corroborou com o resultado obtido na entrada 5, mostrando que tanto em pH 4,27 quanto em pH 4,75, melhores resultados são obtidos com relações de NHS/EDC de pelo menos 1,25 (entradas 8, 10 e 11, TABELA 16).

Destaca-se que não foram encontrados estudos acerca das melhores proporções entre EDC e NHS para aumentar o rendimento dos produtos amida em polissacarídeos. Desta forma, a modificação das carboxilas de ulvana via amidação, proposta no presente trabalho, constituiu uma novidade tanto em relação a utilização da ulvana para modificação, quanto em relação a otimização do processo de amidação em polissacarídeos.

7.6 CARACTERIZAÇÃO DAS ULVANAS-AMIDA Fd5m, Fd3 e Fd6

Lembrando que a modificação química das ulvanas via amidação não teve o objetivo de promover a amidação total dos ácidos urônicos, tendo em vista a importância dos mesmos para atividades biológicas, a partir da otimização da reação de amidação da ulvana, foi selecionada a condição da entrada 8 (TABELA 16) para as reações de amidação preparativas.

As ulvanas-amida foram preparadas de acordo com a condição estabelecida em tampão MES (0,2 mol.L⁻¹), pH inicial 4,27, utilizando 4 meq. de EDC, 5 meq. de NHS e 20 meq. das aminas *n*-pentilamina (Am), 1,3-diaminopropano (DAP) e 1,6-diaminoexano (HMD), originando as frações Fd5m, Fd3 e Fd6, respectivamente (FIGURA 9, página 56).

7.6.1 Análises químicas das frações Fd5m, Fd3 e Fd6

As ulvanas-amida Fd5m, Fd3 e Fd6 apresentaram boas taxas de recuperação após amidação e mostraram porcentagens de carboidratos totais, proteína e sulfato condizentes com a fração original F (TABELA 18), demonstrando que a reação de amidação não altera o grau de sulfatação do polímero.

TABELA 18 - RECUPERAÇÃO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES NATIVA F E Fd5m, Fd3 e Fd6 OBTIDAS APÓS AMIDAÇÃO DA ULVANA DE *U. fasciata*

Frações	Recuperação ^a (%)	Carboidrato ^b (%)	Sulfato ^c (%)	Urônicos ^d (%)	Proteína ^e (%)	Nitrogênio ^f (%)	[α] ^D _g (°)
F ^h	-	72,4	21,2	21,9	1,3	0,61	- 75,5
Fd5m	76,4	70,5	24,7	13,8	1,6	1,08	- 80,3
Fd3	83,4	73,3	23,4	15,4	1,3	1,77	- 77,9
Fd6	88,2	71,0	23,6	18,7	0,9	1,77	- 79,4

Ulvanas-amida Fd5m, Fd3 e Fd6, obtidas da amidação da ulvana com *n*-pentilamina, 1,3-diaminopropano e 1,6-diaminoexano, respectivamente. ^a Recuperação em relação a massa de material submetido a modificação; ^b, ^c, ^d, ^e Determinações de acordo com os métodos de Dubois *et al.* (1956), Dodgson e Price (1962), Filisetti-Cozzi e Carpita (1991) e Lowry *et al.* (1951), respectivamente; ^f Análise elementar de N em g% (m/m); ^g Rotação óptica específica, determinada a 20 °C em solução aquosa 0,2% (m/v); ^h Fração incluída para fins comparativos.

Como esperado, os teores de ácidos urônicos mostraram-se reduzidos nas três reações preparativas (TABELA 18). As frações Fd5m, Fd3 e Fd6 apresentaram, respectivamente, redução de aproximadamente 37, 30 e 15% do conteúdo de ácidos urônicos em relação à fração original F. Este resultado comprova a modificação por amidação de parte dos grupos carboxílicos da ulvana.

O aumento do conteúdo de nitrogênio nas frações modificadas sugere a amidação das ulvanas. Desta forma, as frações Fd3 e Fd6, as quais foram amidadas com 1,3-diaminopropano (DAP) e 1,6-diaminoexano (HMD), respectivamente, apresentaram maiores teores de nitrogênio quando comparadas a fração Fd5m, amidada com *n*-pentilamina (TABELA 18).

Os valores de rotação óptica mostraram que a amidação não altera o caráter óptico das ulvanas (TABELA 18).

7.6.2 Análise de HPSEC-MALLS-RI das frações Fd5m, Fd3 e Fd6

As frações Fd5m, Fd3 e Fd6 apresentaram massas molares ponderais médias (M_w) relativas estimadas em 201.029, 208.117 e 202.287 g.mol⁻¹, respectivamente

(TABELA 19). O cromatograma de HPSEC-MALLS-RI da fração Fd3 ($\bar{M}_w = 1,9$) mostrou um perfil semelhante ao da fração original F (FIGURA 36a e b), enquanto a fração Fd6 ($\bar{M}_w = 1,6$) (FIGURA 36c) mostrou atenuação do ombro a partir de 40 minutos de retenção (FIGURA 36a e c). A dispersão da fração Fd6 foi igual a 1,6 e corresponde a mesma dispersão da fração F original. O cromatograma da fração Fd5m detectado pelo IR mostrou um pico de base alargada de tempo de retenção igual a 38,42 minutos, coincidente com o pico detectado pelo detector MALLS (90°).

TABELA 19 - VALORES DE MASSA MOLAR PONDERAL MÉDIA (M_w) RELATIVA E ESTIMADA POR HPSEC-MALLS-RI, MASSA MOLAR NUMÉRICA MÉDIA (M_n) ESTIMADA POR HPSEC-MALLS-RI E DISPERSÃO (\bar{M}_w) DAS FRAÇÕES F, Fd3, Fd6 e Fd5m

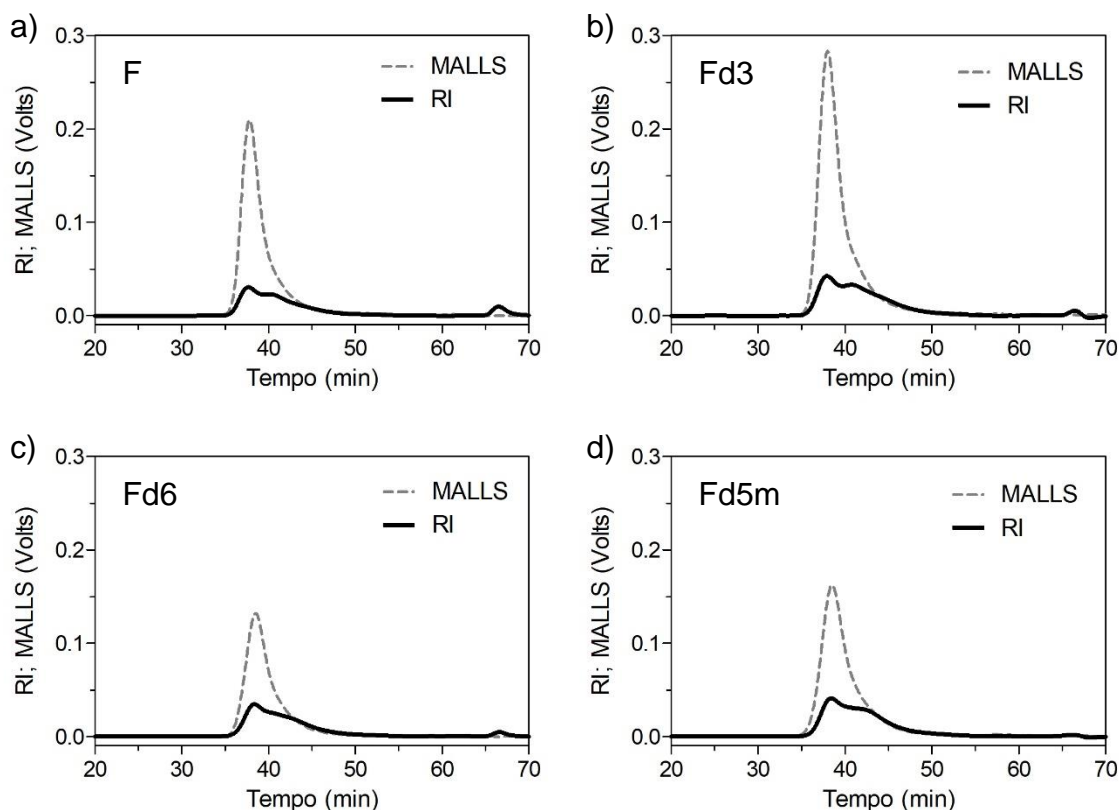
Fração	M_w relativa ^a (g.mol ⁻¹)	M_w estimada ^b (g.mol ⁻¹)	M_n estimada ^b (g.mol ⁻¹)	Dispersão (\bar{M}_w) ^c (M_w/M_n)
F	211.755	558.300	349.900	1,6
Fd3	208.117	458.900	244.700	1,9
Fd6	202.287	348.100	223.300	1,6
Fd5m	201.029	340.090	238.000	1,4

^a Massas molares ponderais médias (M_w) relativas à regressão linear realizada com galactanas sulfatadas obtidas por Colodi, 2011; ^b Valores de massa molar ponderal média (M_w) e massa molar numérica média (M_n) estimadas por HPSEC-MALLS-RI por meio do Software ASTRA; ^c Valores de dispersão calculados pela relação entre os valores de M_w e M_n estimados por HPSEC-MALLS-RI.

Assim como na fração original F, a ulvana-amida Fd5m conservou o perfil de RI, identificado pela expansão do pico principal em ~43 minutos (FIGURA 36a e d). A fração Fd5m apresentou dispersão de 1,4, menor que a calculada para a fração original F ($\bar{M}_w = 1,6$).

É importante destacar que não houve aumento das massas molares ponderais médias (M_w) relativas estimadas para as ulvanas modificadas quando comparadas à ulvana nativa F. Este resultado mostra-se muito positivo, pois demonstra que não houve a formação de interações ou ligações (*crosslinking*) entre as cadeias polissacarídicas das ulvanas modificadas, de maneira que as reações de amidação conduzidas no presente trabalho produziram ulvanas funcionalizadas com grupos amino, sem que estes promovam agregação entre as cadeias das ulvanas-amida.

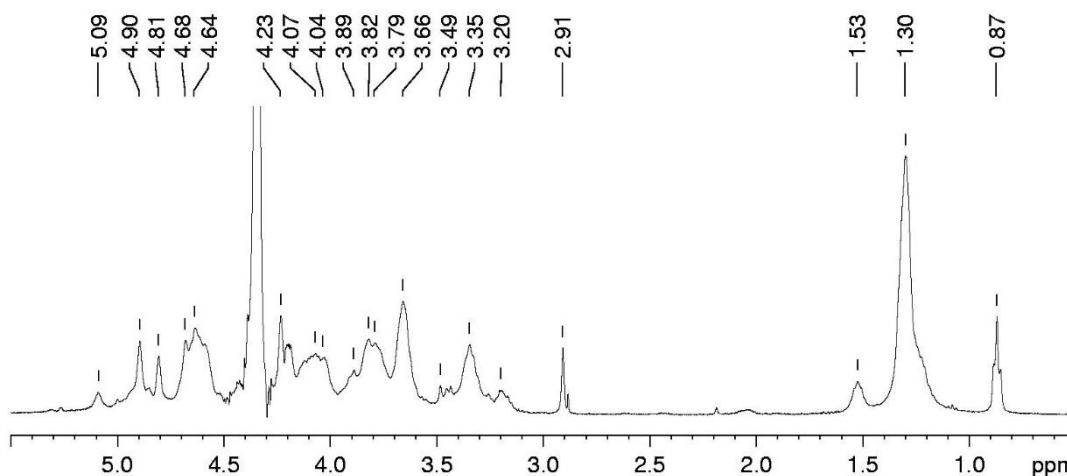
FIGURA 36 - CROMATOGRAMAS DE HPSEC-MALLS-RI DA ULVANA NATIVA F ISOLADA DE *U. fasciata* E DAS ULVANAS-AMIDA Fd3, Fd6 e Fd5m



Cromatogramas de HPSEC-MALLS-RI com o detector MALLS (90°) e índice de refração (RI) plotados em relação ao tempo de retenção (min). Frações a) F, b) Fd3, c) Fd6 e d) Fd5m. FONTE: O autor (2017).

7.6.3 Espectroscopia de RMN das frações Fd5m, Fd3 e Fd6

A fração F foi submetida a reação de amidação em presença de *n*-pentilamina (Am) originando a fração Fd5m. O espectro de RMN de ^1H da fração Fd5m (FIGURA 37) mostrou os hidrogênios do grupo *N*-metil do intermediário da amidação via EDC, identificados pelo sinal em 2,91 ppm, além do sinal centrado em 3,20 ppm referente aos hidrogênios H1' do grupo *N*-(pentil)-amida. Os hidrogênios metilênicos da cadeia alquila foram identificados pelos sinais em 1,53, 1,31 e 0,87 ppm, os quais se sobrepõem ao sinal em 1,30 ppm, referente aos hidrogênios dos grupos $-\text{CH}_3$ das unidades de α -L-ramnose.

FIGURA 37 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO Fd5m

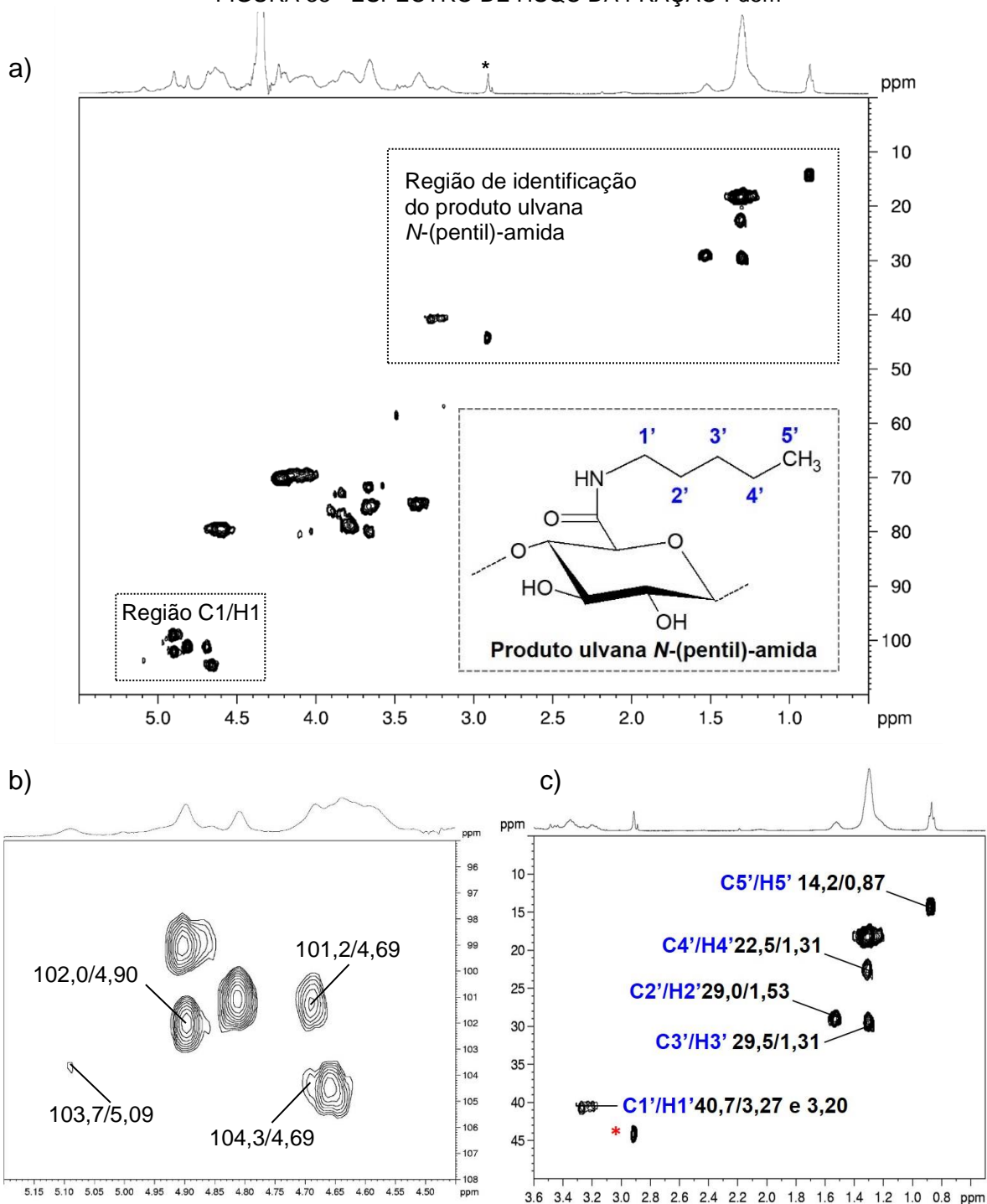
Solvente: D_2O , 70 °C; padrão interno acetona (31,45 e 2,225 ppm). Fonte: O autor (2017).

A análise do espectro de HSQC da fração Fd5m (FIGURA 38) confirmou a presença da correlação em 40,7/3,27, 3,20 ppm, referente a $\text{C1}'/\text{H1}'$ do grupo *N*-(pentil)-amida (FIGURA 38c). Adicionalmente, a região anomérica do espectro de HSCQ da fração Fd5m (FIGURA 38) permitiu identificar uma nova correlação, em 101,2/4,69 ppm, a qual foi atribuída ao $\text{C1}/\text{H1}$ das unidades de α -L-ramnose 3-sulfato ligadas às unidades de ácido β -D-glucurônico modificadas (FIGURA 38b). Ainda, pôde-se observar um deslocamento da correlação referente às unidades de ácido β -D-glucurônico, em 104,3/4,69 ppm, a qual foi atribuída ao $\text{C1}/\text{H1}$ das unidades de ácido β -D-glucurônico modificadas.

Nenhuma das correlações novas encontradas para Fd5m foi detectada nas frações polissacarídicas das entradas 1 e 2 (TABELA 16) obtidas durante a otimização e que apresentaram apenas intermediário *O*-acilisoureia e subproduto *N*-acilureia.

Tendo em vista o aparecimento da correlação em 101,2/4,69 ppm, a amidação dos grupos carboxílicos das unidades de ácido β -D-glucurônico com a *n*-pentilamina parece influenciar as unidades de α -L-ramnose 3-sulfato aos quais estão ligados. No entanto, não foi identificado deslocamento da correlação em 102,0/4,90 ppm, atribuída aos $\text{C1}/\text{H1}$ das unidades de α -L-ramnose 3-sulfato ligadas ao ácido α -L-idurônico, o qual parece sofrer um discreto deslocamento em $\text{C1}/\text{H1}$, de 104,3/5,11 ppm na fração original F para 103,7/5,09 ppm na fração Fd5m (FIGURA 38).

FIGURA 38 - ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO Fd5m



a) Espectro de HSQC da fração Fd5m obtida da amidação da fração polissacarídica F da alga verde *U. fasciata* submetida a amidação com *n*-pentilamina (solvente D₂O, 30 °C); b) inserto do espectro de HSQC da fração Fd5m referente a região anomérica (C1/H1) (solvente D₂O, 70 °C); c) inserto do espectro de HSQC da fração Fd5m referente a região de identificação do produto ulvana *N*-(pentil)-amida (solvente D₂O, 30 °C); intermediário *O*-acilisoureia (*). Padrão interno acetona (31,45 e 2,225 ppm). FONTE: O autor (2017).

Na região de C2/H2 a C6/H6 do espectro de HSQC da fração Fd5m (região não mostrada) não foram detectadas novas correlações, no entanto, observou-se o alargamento das correlações referentes aos C2/H2, C3/H3, C4/H4 e C5/H5, das unidades de ácido β -D-glucurônico, bem como para C2/H2, C3/H3 e C4/H4 das unidades de ácido α -L-idurônico.

A fração Fd3 foi obtida a partir da reação de amidação da fração F em presença de 1,3-diaminopropano (DAP). O espectro de HSQC da fração Fd3 (FIGURA 39) apresentou a correlação em 38,3/3,03 ppm, referente a C3'/H3' do grupo *N*-(3'-aminopropil)-amida ligado à ulvana (FIGURA 39c).

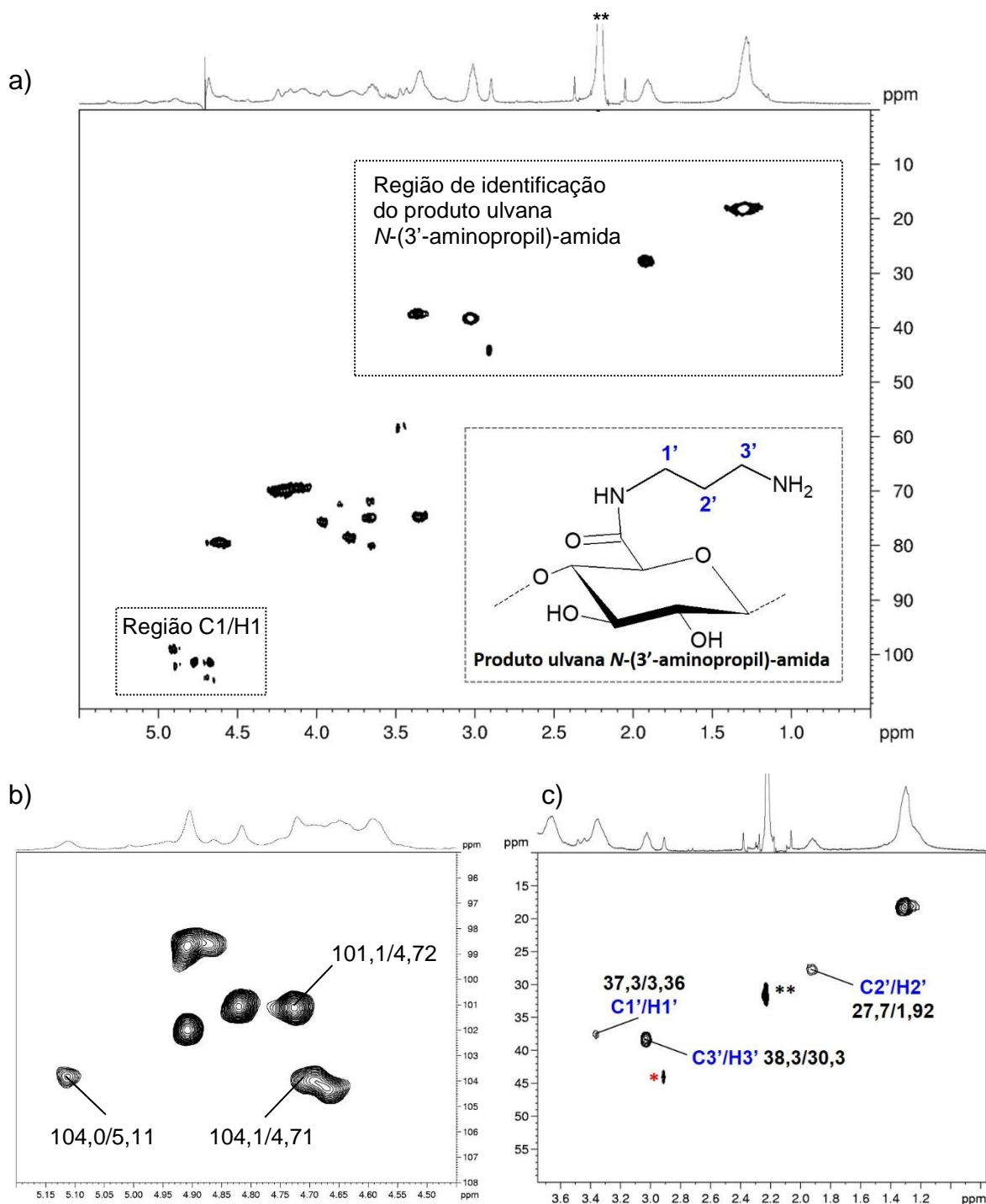
A região anomérica do espectro de HSQC da fração Fd3 (FIGURA 39b) também apresentou uma correlação nova em 101,1/4,72 ppm, a qual foi atribuída ao C1/H1 das unidades de α -L-ramnose 3-sulfato ligadas às unidades de ácido β -D-glucurônico modificadas pela amidação com DAP.

Tanto para a fração Fd3 quanto para a Fd5m as novas correlações mantiveram o valor de deslocamento do C1 e variaram no deslocamento de H1 das unidades de α -L-ramnose 3-sulfato ligadas às unidades de ácido β -D-glucurônico modificadas. Para as frações Fd3 e Fd5m, respectivamente, estes deslocamentos diferem para menos 0,11 e 0,14 ppm em relação à fração original F, a qual apresenta, em 4,83 ppm, o H1 das unidades de α -L-ramnose 3-sulfato ligadas às unidades de ácido β -D-glucurônico (ver FIGURA 28, TABELA 15).

A fração Fd3 também mostrou um deslocamento da correlação referente às unidades de ácido β -D-glucurônico, em 104,1/4,71 ppm, a qual foi atribuída ao C1/H1 das unidades de ácido β -D-glucurônico modificadas com DAP (FIGURA 39b). As unidades de ácido α -L-idurônico parecem não ter sofrido deslocamento em C1/H1, permanecendo a correlação em 104,0/5,11 ppm (FIGURA 39b).

A região de C2/H2 a C6/H6 do espectro de HSQC da fração Fd3 (FIGURA 39) não apresentou alterações nas correlações dos carbonos e hidrogênios das unidades de ácido α -L-idurônico. No entanto, foi identificada uma correlação nova em 75,5/3,95 ppm, à qual foi atribuída aos C5/H5 das unidades de ácido β -D-glucurônico, tendo em vista o desaparecimento do sinal em 77,0/3,82 ppm (ver TABELA 15). Ainda foram identificadas as correlações em 79,8/3,69, 74,7/3,64 e 74,5/3,80 ppm, às quais foram atribuídas aos C4/H4, C3/H3 e C2/H2, respectivamente, das unidades de ácido β -D-glucurônico.

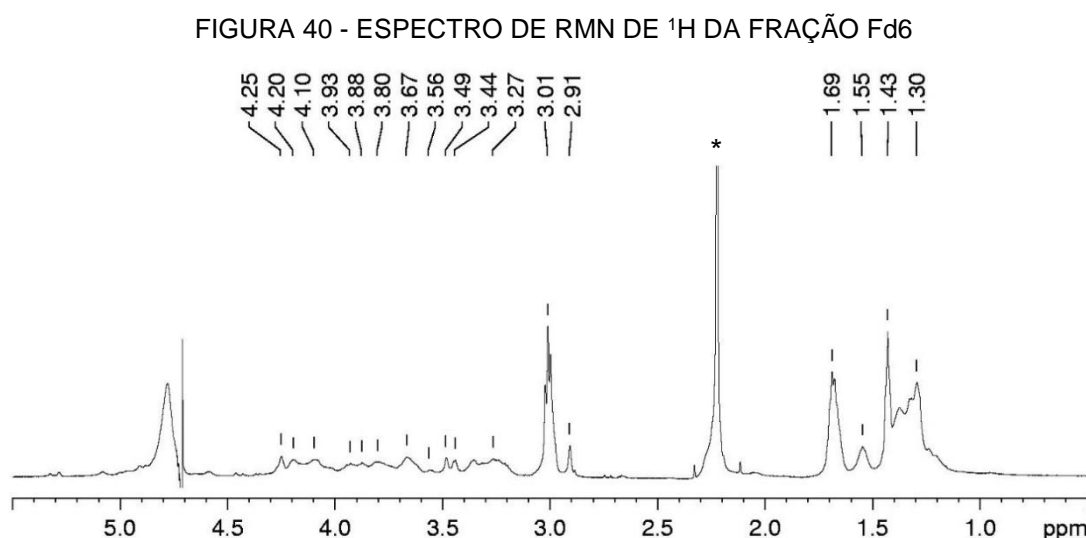
FIGURA 39 - ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO Fd3



a) Espectro de HSQC da fração Fd3 obtida da amidação da fração polissacarídica F da alga verde *U. fasciata* submetida a amidação com 1,3-diaminopropano (solvente D₂O, 30 °C); b) inserto do espectro de HSQC da fração Fd3 referente a região anomérica (C1/H1) (solvente D₂O, 70 °C); c) inserto do espectro de HSQC da fração Fd3 referente a região de identificação do produto ulvana *N*-(3'-aminopropil)-amida (solvente D₂O, 30 °C); intermediário O-acilisoureia (*). Padrão interno acetona (31,45 e 2,225 ppm) (**). FONTE: O autor (2017).

A fração F foi submetida a reação de amidação em presença de 1,6-diaminoexano (HMD) originando a fração Fd6. O espectro de RMN de ^1H da fração Fd6 (FIGURA 40) mostrou os hidrogênios do grupo *N*-metil do intermediário *O*-acilisoureira, identificado pelo sinal em 2,91 ppm, além do sinal centrado em 3,01 ppm referente aos hidrogênios metilênicos H6' do grupo *N*-(6'-aminohexil)-amida ligado à ulvana.

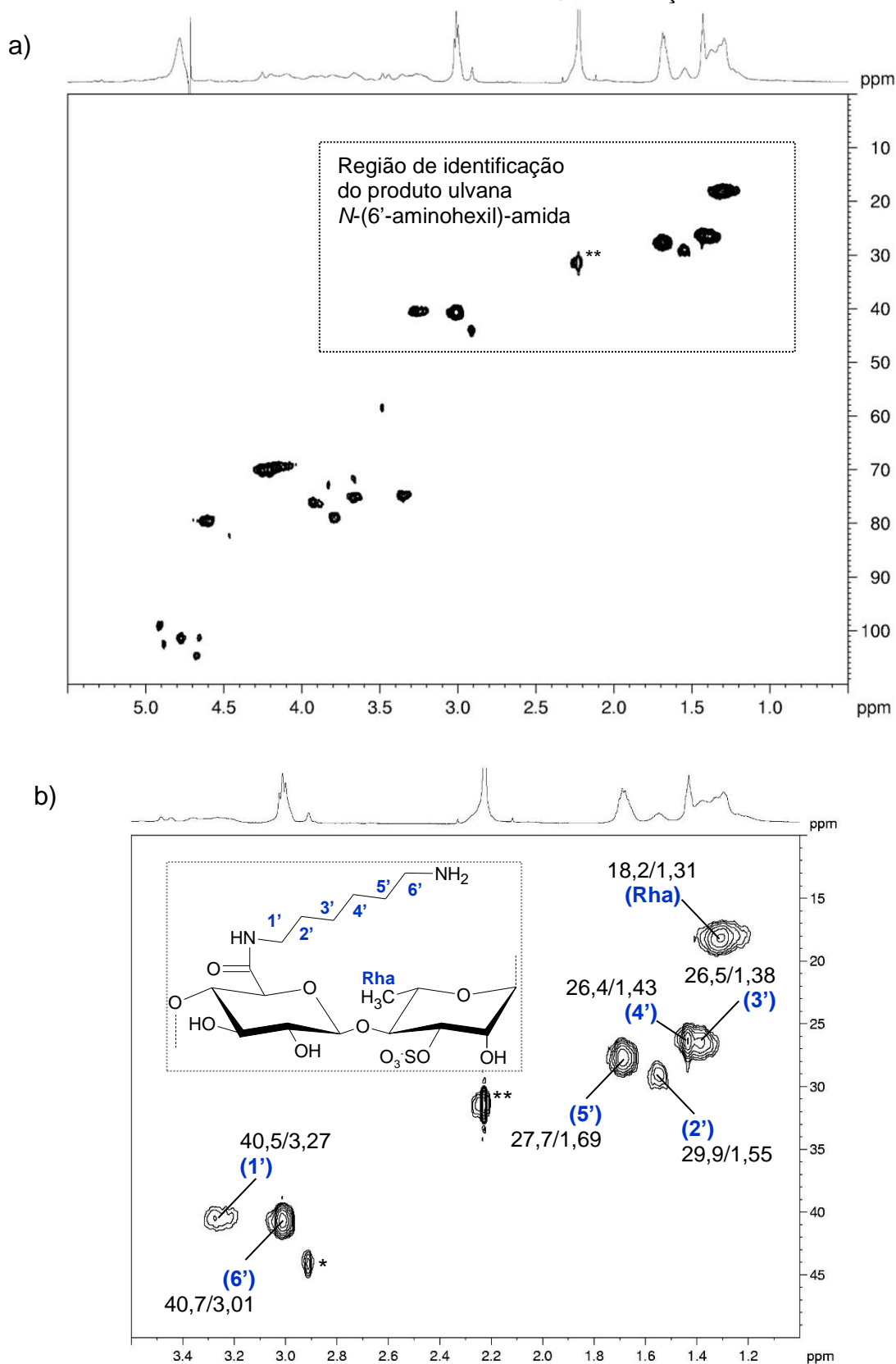
Os carbonos e hidrogênios do grupo *N*-(6'-aminohexil)-amida foram identificados pelas correlações em (1') 40,5/3,27, (2') 29,0/1,55, (3') 26,5/1,38, (4') 26,4/1,43, (5') 27,7/1,69 e (6') 40,7/3,01 ppm presentes no espectro de HSQC da fração Fd6 (FIGURA 41b).



Solvente: D_2O , 30 °C; padrão interno acetona (*) (31,45 e 2,225 ppm). Fonte: O autor (2017).

Assim como as frações Fd5m e Fd3, a região anomérica do espectro de HSQC da fração Fd6 também apresentou uma correlação nova em 101,1/4,69 ppm, a qual foi atribuída ao C1/H1 das unidades de α -L-ramnose 3-sulfato ligadas às unidades de ácido β -D-glucurônico modificadas pela amidação com HMD, apresentando também a diferença de menos 0,11 ppm em relação à fração original F, como a fração Fd5m. Esta diferença de menos 0,11 ppm pode estar relacionada às aminas substituintes, posto que estas apresentam tamanhos similares. A fração Fd6 também mostrou um deslocamento da correlação referente às unidades de ácido β -D-glucurônico, em 104,3/4,70 ppm, a qual foi atribuída ao C1/H1 das unidades de ácido β -D-glucurônico modificadas com HMD.

FIGURA 41 - ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO Fd6

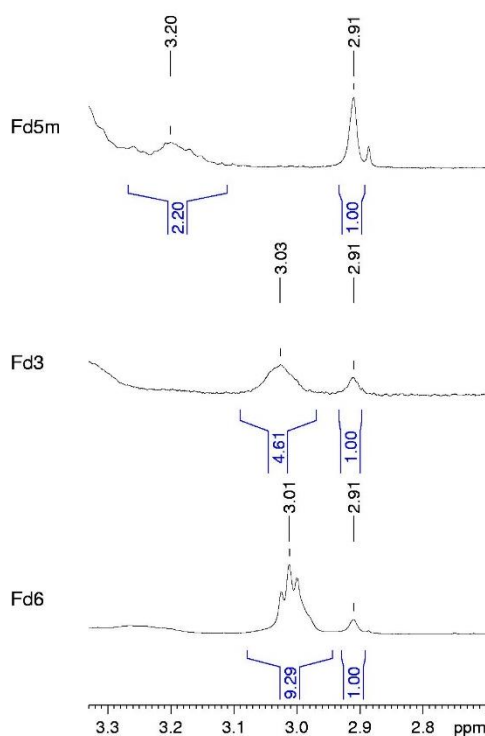


a) Espectro de HSQC da fração Fd6 obtida da amidação da fração polissacarídica F em presença de 1,6-diaminoexano; b) inserto da região do espectro de HSQC da fração Fd6 que identifica o grupo *N*-(6'-aminohexil)-amida. Correlação em 44,1/2,91 referente ao intermediário *O*-acilisoureia (*). Solvente: D₂O, 30 °C; padrão interno acetona (**) (31,45 e 2,225 ppm). Fonte: O autor (2017).

A região de C2/H2 a C6/H6 do espectro de HSQC da fração Fd6 (FIGURA 41a), assim como na fração Fd5m, mostrou o alargamento das correlações referentes aos C2/H2, C3/H3, C4/H4 e C5/H5, das unidades de ácido β -D-glucurônico, bem como para C2/H2, C3/H3 e C4/H4 das unidades de ácido α -L-idurônico.

A FIGURA 42 mostra as integrações para a região de 3,3 a 2,8 ppm dos hidrogênios do grupo *N*-metil do intermediário *O*-acilisoureia, identificados pelo sinal em 2,91 ppm, em relação aos hidrogênios metilênicos (-CH₂-) da cadeia *N*-alquil amida ligada à ulvana em 3,20, 3,03 e 3,01 ppm, respectivamente, para as frações Fd5m, Fd3 e Fd6.

FIGURA 42 - INTEGRAÇÕES DOS ESPECTROS DE RMN DE ¹H DAS FRAÇÕES Fd5m, Fd3 E Fd6



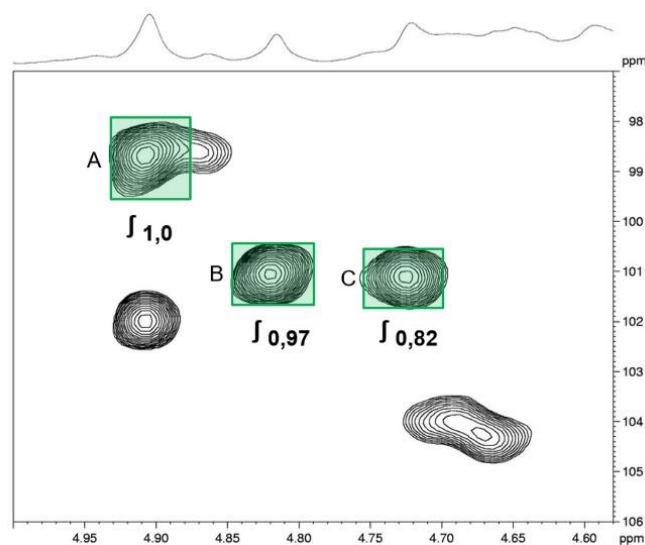
Integrações para a região de 3,3 a 2,8 ppm dos espectros de RMN de H¹ das frações Fd5m, Fd3 e Fd6. Solvente: D₂O, 70 e 30 °C; padrão interno acetona (31,45 e 2,225 ppm). Fonte: O autor (2017).

Estas integrações das ulvanas-amida Fd5m, Fd3 e Fd6, produzidas em escala preparativa, mostraram que a condição otimizada para a reação com a DAP foi reproduzida na reação de amidação preparativa (relação produto/intermediários igual a 14). No entanto, os produtos das reações de amidação preparativas, as quais foram conduzidas com a *n*-pentilamina e com a 1,6-diaminoexano, mostraram relações diferenciadas entre os produtos amida e o intermediário *O*-acilisoureia.

As integrações da FIGURA 42 mostraram que as frações Fd5m e Fd6 apresentaram, respectivamente, relações de 6,5 e 27 unidades amidadas para uma unidade na forma de intermediário reacional. Estes dados demonstraram que as diferentes aminas interagem de formas diferenciadas com o polissacarídeo e para se obter elevados graus de substituição, a otimização deve ser realizada para cada tipo de amina a ser utilizada.

Uma estimativa da formação dos produtos amida nas unidades de ácido β -D-glucurônico pôde ser realizada através da integração dos espectros de HSCQ das frações Fd5m, Fd3 e Fd6. Assim, como mostra a FIGURA 43, as correlações referentes as unidades de α -L-ramnose 3-sulfato das díades do tipo U_{3s} (A, calibradas para 1), A_{3s} (B) e ligadas a ácido β -D-glucurônico amida (C) foram integradas e as áreas resultantes de B e C foram relacionadas, demonstrando as porcentagens de amidação das unidades de ácido β -D-glucurônico.

FIGURA 43 - INSERTO DA REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO Fd3



Integração das correlações anoméricas do espectro de HSCQ da fração Fd3 utilizada para estimar a formação dos produtos amida nas unidades de ácido β -D-glucurônico: áreas A, B e C referem-se a unidades de α -L-ramnose 3-sulfato das díades do tipo U_{3s} , A_{3s} e ligadas a ácido β -D-glucurônico amida, respectivamente. Solvente: D_2O , 70 °C; padrão interno acetona (31,45 e 2,225 ppm). Fonte: O autor (2017).

As relações de integração indicaram 37, 46 e 20% de amidação para as frações Fd5m, Fd3 e Fd6, respectivamente. Estas estimativas acompanharam as diminuições dos conteúdos de ácidos urônicos observadas por dosagem colorimétrica (TABELA 18).

Estas ulvanas-amida inéditas Fd3 e Fd6 foram submetidas a reações de aminação redutiva na presença da *kappa*-carrabiose (fração Kb, FIGURA 20, página 90), com o intuito de demonstrar a reatividade dos grupos amino livres inseridos nas ulvanas via amidação. Desta forma foram obtidos polissacarídeos híbridos compostos por ulvana e dissacarídeos de *kappa*-carragenana.

A seguir são abordados os dados de otimização da reação de aminação redutiva para a fração Fd3 em presença da *kappa*-carrabiose (Kb).

7.7 SEMISSÍNTESE DE POLISSACARÍDEOS HÍBRIDOS A PARTIR DAS ULVANAS-AMIDA Fd3 E Fd6

Posteriormente à inserção de grupos amina nas ulvanas por meio de amidação via EDC, a semissíntese dos polissacarídeos híbridos (7) foi realizada por meio de reação de aminação redutiva em presença das ulvanas-amidas, Fd3 e Fd6 (5), *kappa*-carrabiose (fração Kb) (6) e agente redutor (FIGURA 44).

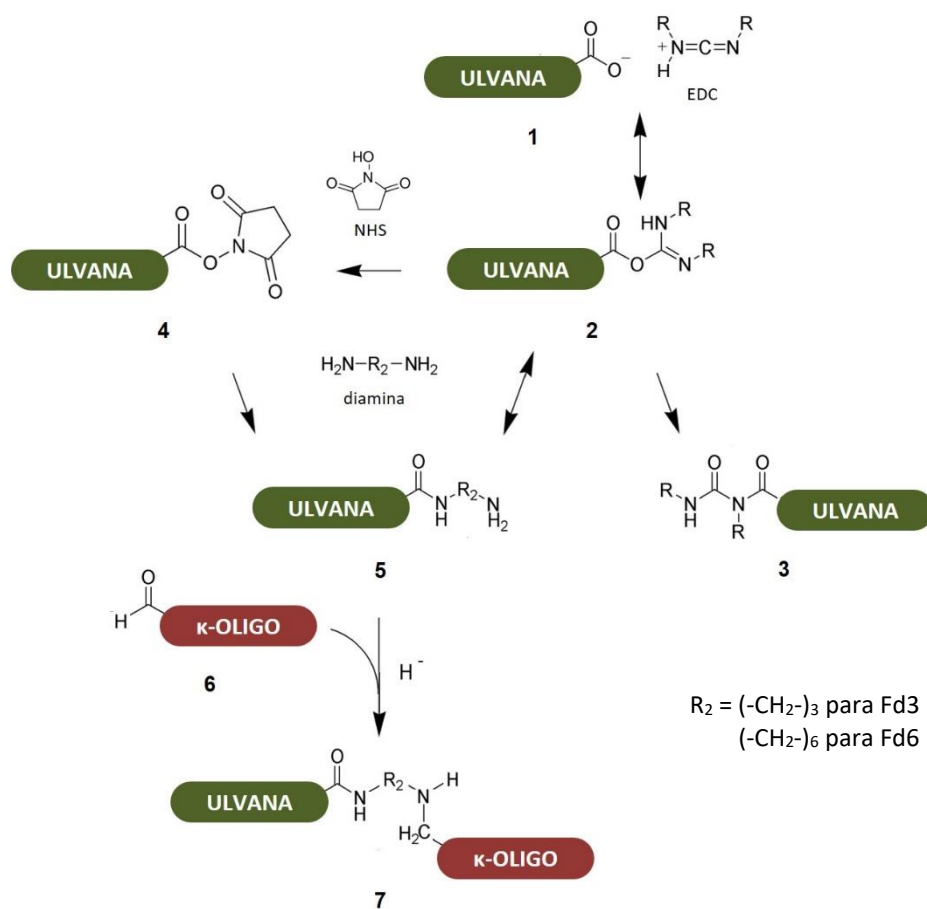
Os grupos amina livres inseridos nas ulvanas Fd3 e Fd6 correspondem a aminas primárias e atuam como nucleófilos ao reagir com os carbonos carbonílicos da *kappa*-carrabiose presente na fração Kb, podendo formar uma amina secundária via intermediários hemiaminal (aminoálcool) ou imina e íon imínio. Os íons imínio, em presença de agente redutor, sofrem transferência de íons hidreto e são reduzidos, formando uma nova ligação C-N, a qual constitui a ligação covalente entre a fração Kb e a ulvana-amida (Abdel-Magid *et al.*, 1996; Solomons e Fryhle, 2002).

As reações de aminação redutiva podem ser realizadas em meio aquoso (Yalpani, 1980), no entanto, segundo Borch e colaboradores (1971), podem levar a rendimentos menores que em metanol. Adicionalmente, a formação do íon imínio é facilitada em presença de metanol (Abdel-Magid *et al.*, 1996). Portanto, as reações de otimização incluíram ensaios com metanol, misturas metanol/água e apenas água (TABELA 20).

Destaca-se que todas as misturas submetidas a reação de aminação redutiva permaneceram sob agitação por 5 a 7 h previamente à adição do agente redutor. O cianoboroidreto de sódio (NaBH_3CN) foi selecionado como agente redutor por ser estável em pH ácido, além de ser brando, apresentando certa quimiosseletividade em relação a aldeídos e iminas, o que oferece maior eficiência nas reações de aminação redutiva (Abdel-Magid *et al.*, 1996; Borch e Durst, 1969).

Após a adição de NaBH_3CN , os meios reacionais tiveram o pH inicial ajustado para 5,0, quando necessário, e permaneceram sob agitação por 15 h a 55 °C. Os polissacarídeos resultantes foram dialisados contra água destilada (entrada 1, TABELA 20) ou sequencialmente contra água destilada, NaCl 1 mol.L⁻¹ e água destilada, tendo sido liofilizados e analisados por RMN.

FIGURA 44 - ESQUEMA GERAL DA AMIDAÇÃO DA ULVANA E POSTERIOR LIGAÇÃO A KAPPA-CARRABIOSE (Kb)



Fonte: O autor (2017).

7.7.1 Otimização da reação de aminação-redutiva

A primeira reação de aminação redutiva foi realizada a partir de uma porção da fração Fd3 solubilizada em metanol (0,7 g%), adição de 1 meq. de Kb, 1,5 meq. de AcOH , 2,5 meq. de NaBH_3CN a 55 °C por 15 h (entrada 1, TABELA 20). Antes da adição de AcOH e NaBH_3CN o meio reacional permaneceu de 5 a 7 h sob agitação a temperatura ambiente. Ao início da reação o pH foi igual a 5,0. Após as 15 h a 55 °C,

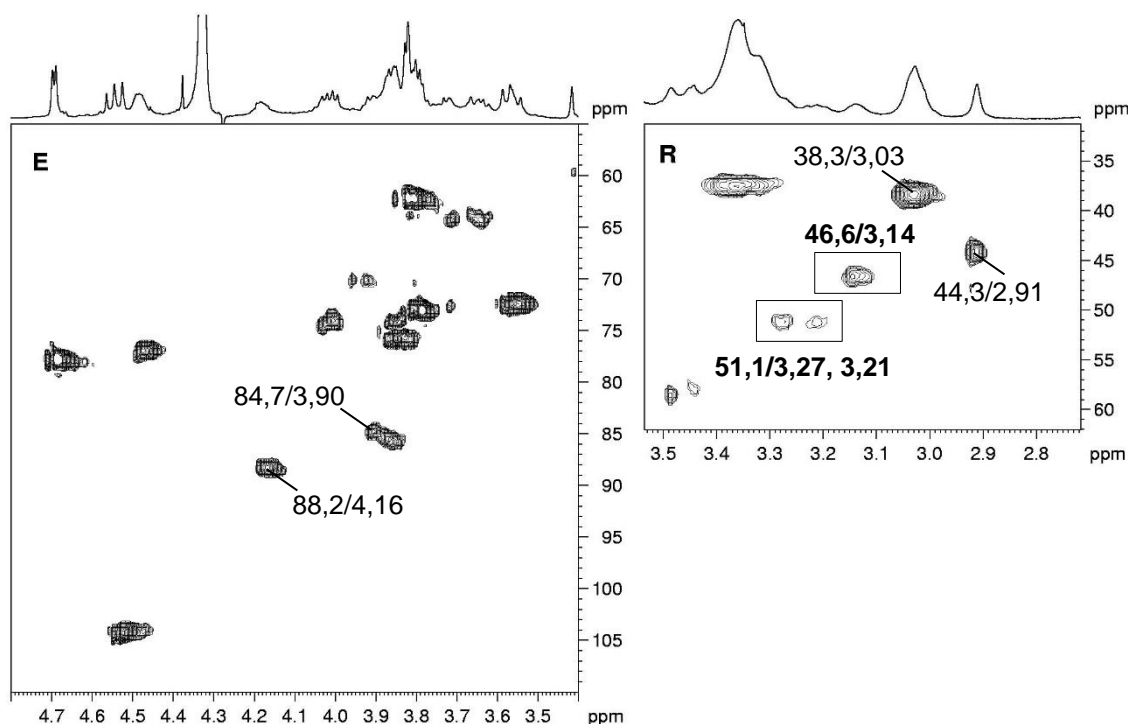
o polissacarídeo foi recuperado por diálise (MWCO 6-8 KDa) apenas contra água destilada.

O conteúdo eluído pela diálise, apresentou-se positivo para teste de carboidrato com fenol-ácido sulfúrico, foi recuperado e analisado por RMN. O pH da solução polissacarídica resultante após diálise e liofilização foi igual a 4, enquanto o pH do conteúdo eluído pela diálise e liofilizado foi 8,5.

Regiões dos espectros de HSQC, da fração retida (R) e eluída da diálise (E), realizados a 30 e 70 °C, respectivamente, são apresentadas na FIGURA 45.

A fração E, eluída por diálise, mostrou correlações similares a *kappa*-carrabiose presente na fração Kb, exceto pelas correlações em 88,2/4,16 e 84,7/3,90 ppm, que foram atribuídas respectivamente a C4/H4 e C3/H3 das unidades de 3,6-anidro-D-galactitol, indicando a redução da *kappa*-carrabiose ao seu derivado alditol (*kappa*-carrabiitol) (FIGURA 45).

FIGURA 45 - INSERTOS DOS ESPECTROS DE HSQC DAS FRAÇÕES R E E OBTIDAS DA DIÁLISE DO PRODUTO DA REAÇÃO DE AMINAÇÃO REDUTIVA COM AS FRAÇÕES ULVANA-AMIDA Fd3 E *KAPPA*-CARRABIOSE Kb



Insertos dos espectros de HSQC das frações R (retida) e E (eluída) obtidas da diálise do produto da reação de aminação redutiva com as frações ulvana-amida Fd3 e *kappa*-carrabiose Kb (entrada 1, TABELA 20). Solvente: D₂O, 30 e 70 °C; padrão interno acetona (31,45 e 2,225 ppm). Fonte: O autor (2017).

A fração R, retida na diálise, apresentou as correlações da ulvana Fd3, bem como as correlações indicando a presença de unidades de β -D-galactose 4-sulfato proveniente do dissacarídeo da fração Kb (região não mostrada). As correlações em 46,6/3,14 e 51,1/3,27, 3,21 ppm, destacadas na FIGURA 45, foram atribuídas, respectivamente, aos carbonos e hidrogênios metilênicos da extremidade C3'/H3' do grupo *N*-(3'-aminopropil)-amida substituído e C1/H1,1' das unidades de 3,6-anidro-D-galactose, indicando a ligação da ulvana ao dissacarídeo derivado de *kappa*-carragenana. No entanto, a correlação em 38,3/3,03 ppm de C3'/H3' do grupo *N*-(3'-aminopropil)-amida não substituído ainda se mostrou presente, indicando a presença de extremidades livres de amina capazes de ligar mais dissacarídeos redutores Kb.

A presença de oligossacarídeo Kb reduzido na fração eluída E e extremidades de amina livres na ulvana, recuperada na fração R, demonstrou que as condições de aminação redutiva poderiam ser aprimoradas para ligar mais Kb. Desta forma, seguiram-se as reações de aminação redutiva para otimizar a ligação de Kb à ulvana-amida Fd3 (TABELA 20).

A partir dos espectros de RMN de ^1H dos polissacarídeos obtidos nos ensaios de aminação redutiva foram realizadas as integrações dos sinais em 3,14 e 3,05 ppm, os quais permitiram quantificar a proporção entre as extremidades de amina ligadas ao oligossacarídeo Kb e livres, respectivamente (TABELA 20).

A baixa relação de ligação entre Kb e Fd3 da entrada 1 (0,30) (TABELA 20) foi atribuída à baixa solubilidade das frações Fd3 e Kb em metanol. Desta forma, a reação de aminação redutiva da entrada 2 foi conduzida em uma mistura água/metanol (1:3), tendo sido aumentados também os equivalentes de Kb (3 meq.) e NaBH_4CN (5 meq.).

A adição de água ao meio reacional melhorou a solubilização de Fd3 e Kb. A adição de maiores equivalentes de Kb e NaBH_4CN foram positivos. Nestas condições, a relação de integração de 1,66 sugere que, aproximadamente, para cada 8 grupos amino da ulvana, 5 estão ligados à Kb (TABELA 20).

Borch e colaboradores (1971) afirmam que o pH ótimo para aminação redutiva é entre 6 a 8, mas que ela ocorre em pH entre 4 a 10, contanto que exista quantidade suficiente de hidrogênios para a formação do íon imínio. Segundo estes autores, a formação do íon imínio constitui a etapa lenta da reação de aminação redutiva.

Adicionalmente, o grupo carbonílico compete com o intermediário imínio pela protonação e subsequentemente pelo hidreto na etapa de redução. Isto leva à redução do grupo carbonila e do agente redutor. Assim, sugere-se a adição de AcOH ao meio reacional (Abdel-Magid *et al.*, 1996).

TABELA 20 - OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS DE AMINAÇÃO REDUTIVA COM AS FRAÇÕES ULVANA-AMIDA (Fd3) E KAPPA-CARRABIOSE (Kb)

Entrada	Kb ^a (meq.)	Meio reacional ^b H ₂ O : MeOH	AcOH (meq.)	NaBH ₄ CN (meq.)	Aminação redutiva		Relação ^c J 3,14 / J 3,05	Relação ^d (%)
					pH _{inicial}	pH _{final}		
1	1	0:1	1,5	2,5	5,0	5,5	0,30	23
2	3	1:3	-	5	5,0	6,0	1,66	62
3	3	1:3	20	10	5,0	4,5	7,11	88
4	1,5	1:3	6	5	5,0	5,0	1,20	54
5	8	1:1	1,5	2,5	5,0	5,5	7,13	88
6	8	1:1	3	5	5,0	5,5	6,46	87
7	8	1:0	1,5	2,5	5,0	5,0	2,60	72
8	8	1:0	3	2,5	5,0	5,0	6,38	86
9	8	1:0	1,5	5	5,0	7,0	7,64	88

^a Equivalentes calculados em relação ao conteúdo de ácido urônico da ulvana F; ^b Proporções entre H₂O e metanol do meio reacional; ^c Relação entre a intensidade das integrações dos sinais 3,14 e 3,05 ppm no espectro de RMN de ¹H, referentes, respectivamente, aos hidrogênios do grupo -CH₂- 3'-ligado ao dissacarídeo (produto aminado) e livre; ^d Relação de integração representada em porcentagem de extremidades -CH₂- ligadas ao dissacarídeo (produto aminado).

Desta forma, na entrada 3, foram adicionados 20 meq. de AcOH e os equivalentes de NaBH₄CN foram dobrados. Koshida e colaboradores (2001) utilizaram 20 eq. de NaBH₄CN no processo de aminação de oligossacarídeos sulfatados. As condições reacionais da entrada 3 elevaram o rendimento de ligação de Kb à Fd3 em 42% em relação à entrada 2 (TABELA 20).

Na reação da entrada 4, foi verificada a possibilidade de diminuição do uso de Kb e NaBH₄CN, reduzindo-os pela metade, enquanto AcOH foi reduzido em 3,3 vezes. A grande diminuição de ligação de Kb à Fd3, observada para esta condição, foi atribuída a diminuição dos equivalentes de Kb (TABELA 20).

As reações de aminação redutiva, geralmente, são conduzidas com excesso de amina de pelo menos 5 vezes (Borch *et al.*, 1971). No entanto, a condição de aminação redutiva entre Fd3 e Kb inclui características especiais, pois os grupos amino estão ligados à ulvana, o que pode reduzir sua mobilidade no meio reacional, de forma que quanto mais Kb, maiores as chances de ocorrer o ataque nucleofílico.

Assim, para avaliar o meio reacional com maior proporção de água e reduzidos equivalentes de AcOH e NaBH₄CN, optou-se por utilizar 2,7 vezes mais Kb que na entrada 3, de maior rendimento (entrada 5, TABELA 20). Desta forma fixaram-se os equivalentes de Kb em 8 meq. para todos os ensaios posteriores.

A reação de aminação redutiva utilizada na entrada 5 foi conduzida em meio reacional de água/metanol na proporção de 1:1, com 8 meq. de Kb e quantidades de AcOH e NaBH₄CN diminuídas. Assim, com a obtenção de aproximadamente 88% de adição aos grupos amino, pela entrada 5, verificou-se que mesmo diminuindo a proporção de metanol no meio reacional houve aminação redutiva em quantidade semelhante à condição da entrada 3. Observou-se também que, para esta condição, a utilização de maiores equivalentes de AcOH e NaBH₄CN não aumentou a proporção de ligação de Kb à Fd3 (entrada 6). Assim, em água/metanol na proporção de 1:1, sugere-se a utilização dos menores equivalentes de AcOH e NaBH₄CN para obter taxas semelhantes de ligação de Kb à Fd3 (entradas 5 e 6, TABELA 20).

As taxas de aminação redutiva em meio aquoso foram analisadas pelas reações das entradas 7, 8 e 9. Primeiramente, na entrada 7, a reação de aminação redutiva foi reproduzida em água com os mesmos equivalentes reacionais utilizados na reação da entrada 5 e verificou-se uma redução de ~20% na taxa de aminação (88 para 72%). As condições reacionais das entradas 8 e 9, avaliaram o aumento de AcOH e NaBH₄CN, respectivamente, demonstrando que em meio aquoso, com 8 meq. de Kb, 1,5 meq. de AcOH e 5 meq. de redutor, é possível reproduzir os maiores rendimentos obtidos para os meios com metanol (entradas 3, 5 e 9, TABELA 20).

Desta forma, a condição de aminação redutiva em meio aquoso, referente a entrada 9 da TABELA 20, foi utilizada nas reações preparativas para obtenção dos polissacarídeos híbridos Fd3-Kb e Fd6-Kb.

Destaca-se ainda que as reações de otimização avaliadas revelaram três condições ótimas de aminação redutiva (entradas 3, 5 e 9) em meios reacionais de composições diferentes, aquoso (entrada 9) ou misturas água/metanol 1:1 (entrada 5) e 1:3 (entrada 3) (TABELA 20). Esta observação é importante porque sugere que diferentes compostos redutores, mesmo que apresentem características químicas e solubilidades diferenciadas, são passíveis de ser adicionados à ulvana-amida Fd3.

7.8 CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS HÍBRIDOS Fd3-Kb E Fd6-Kb

Os polissacarídeos híbridos Fd3-Kb e Fd6-Kb foram semissintetizados a partir das condições de aminação redutiva otimizadas para o meio aquoso (TABELA 20). As reações de aminação redutiva foram conduzidas, separadamente, em água com as ulvanas-amida Fd3 e Fd6, 8 meq. de *kappa*-carrabiose (Kb), 1,5 meq. de AcOH e 5 meq. de NaBH₃CN, em pH inicial igual a 5,0, sob agitação a 55 °C por 15 h. As misturas reacionais foram dialisadas e os polissacarídeos híbridos foram recuperados após liofilização, resultando nas frações Fd3-Kb e Fd6-Kb.

7.8.1 Análises químicas das frações Fd3-Kb e Fd6-Kb

Os polissacarídeos híbridos Fd3-Kb e Fd6-Kb mostraram recuperação de massa acima de 100%, o que condiz com a adição de *kappa*-carrabiose às ulvanas-amida Fd3 e Fd6 (TABELA 21). Ainda, as análises de carboidratos totais, proteínas e sulfato mostraram que o processo de aminação redutiva não promoveu degradação dos polímeros e manteve o grau de sulfatação dos mesmos (TABELA 21).

TABELA 21 - RECUPERAÇÃO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES HÍBRIDAS Fd3-Kb e Fd6-Kb OBTIDAS DAS ULVANAS AMIDA DE *U. fasciata* E DA *KAPPA*-CARRABIOSE DE *K. alvarezii*

Frações	Recuperação ^a (%)	Carboidrato ^b (%)	Sulfato ^c (%)	Urônicos ^d (%)	Proteína ^e (%)	Nitrogênio ^f (%)	[α] ^{Dg} (°)
Fd3 ^h	83,4	73,3	23,4	15,4	1,3	1,77	- 77,9
Fd3-Kb	140,2	65,7	21,9	12,4	2,7	1,56	- 53,7
Fd6 ^h	88,2	71,0	23,6	18,7	0,9	1,77	- 79,4
Fd6-Kb	129,5	69,2	21,7	15,3	1,9	1,16	- 59,4

^a Recuperação em relação a massa de material submetido a modificação; ^b, ^c, ^d, ^e Determinações de acordo com os métodos de Dubois *et al.* (1956), Dodgson e Price (1962), Filisetti-Cozzi e Carpita (1991) e Lowry *et al.* (1951), respectivamente; ^f Análise elementar de N em g% (m/m); ^g Rotação óptica específica, determinada a 20 °C em solução aquosa 0,2% (m/v); ^h Fração incluída para fins comparativos.

A adição da *kappa*-carrabiose, às ulvanas Fd3 e Fd6, não alterou a porcentagem de sulfato dos polissacarídeos híbridos Fd3-Kb e Fd6-Kb, pois a dosagem de sulfato considera a porcentagem de grupos sulfato em massa de polímero. Assim, a adição dos dissacarídeos também aumentou a massa a ser analisada e como a *kappa*-carrabiose apresenta-se substituída por um grupo sulfato

em C4 da unidade β -D-galactopirranose, as frações híbridas resultaram na mesma proporção de sulfato anterior à adição de Kb (TABELA 21).

Da mesma forma que não houve aumento na porcentagem de sulfato para as frações Fd3-Kb e Fd6-Kb em relação às frações originais Fd3 e Fd6, os conteúdos de ácidos urônicos foram muito discretamente diminuídos para as frações híbridas. Pois, sem haver aumento do conteúdo de ácidos urônicos, o aumento da massa correspondeu à diminuição de, aproximadamente, três pontos percentuais de ácidos urônicos para as frações híbridas Fd3-Kb e Fd6-Kb (TABELA 21). A porcentagem de nitrogênio dos polissacarídeos híbridos Fd3-Kb e Fd6-Kb, também se encontrou reduzida em função da adição de massa aos polímeros originais Fd3 e Fd6.

Os polissacarídeos híbridos semissintetizados por aminação redutiva são compostos por moléculas de propriedades ópticas opostas. As ulvanas apresentam rotação óptica específica negativa, enquanto os oligossacarídeos de *kappa*-carragenana mostram valores positivos de rotação óptica. Portanto, observou-se a diminuição dos valores absolutos de rotação óptica específica para os polissacarídeos híbridos, de forma que estes valores intermediários corroboraram para confirmar a ligação de Kb aos grupos amino livres presentes nas frações Fd3 e Fd6 (TABELA 18).

7.8.2 Análise de HPSEC-MALLS-RI das frações Fd3-Kb e Fd6-Kb

As análises das frações Fd3-Kb e Fd6-Kb por HPSEC-MALLS-RI permitiram estimar os valores de massas molares ponderais médias (M_w) relativas para os polissacarídeos híbridos (TABELA 22) por meio da curva de calibração com galactanas sulfatadas (página 65). No entanto, de acordo com os valores de M_w relativos, não houve aumento na massa das frações Fd3-Kb e Fd6-Kb em relação às frações originais Fd3 e Fd6. Os valores de M_w foram estimados em 206.393 e 199.971 g.mol⁻¹ para Fd3-Kb e Fd6-Kb, respectivamente (TABELA 22).

A ulvana-amida híbrida Fd3-Kb apresentou, pelo detector RI, um perfil cromatográfico de base bastante alargada que apresentou detecção por MALLS (90°) condizente com as frações originais F e Fd3 (FIGURA 46a e b). A dispersão da fração Fd3-Kb foi igual a 3,0 (TABELA 22).

TABELA 22 - VALORES DE MASSA MOLAR PONDERAL MÉDIA (M_w) RELATIVA E ESTIMADA POR HPSEC-MALLS-RI, MASSA MOLAR NUMÉRICA MÉDIA (M_n) ESTIMADA POR HPSEC-MALLS-RI E DISPERSÃO (\bar{D}) DAS FRAÇÕES Fd3, Fd6, Fd3-Kb e Fd6-Kb

Fração	M_w relativa ^a (g.mol ⁻¹)	M_w estimada ^b (g.mol ⁻¹)	M_n estimada ^b (g.mol ⁻¹)	Dispersão (\bar{D}) ^c (M_w/M_n)
Fd3 ^d	208.117	458.900	244.700	1,9
Fd6 ^d	202.287	348.100	223.300	1,6
Fd3-Kb	206.393	380.800	125.000	3,0
Fd6-Kb	199.971	269.500	117.900	2,3

^a Massas molares ponderais médias (M_w) relativas à regressão linear realizada com galactanas sulfatadas obtidas por Colodi, 2011; ^b Valores de massa molar ponderal média (M_w) e massa molar numérica média (M_n) estimadas por HPSEC-MALLS-RI por meio do Software ASTRA; ^c Valores de dispersão calculados pela relação entre os valores de M_w e M_n estimados por HPSEC-MALLS-RI; ^d Frações representadas para fins comparativos.

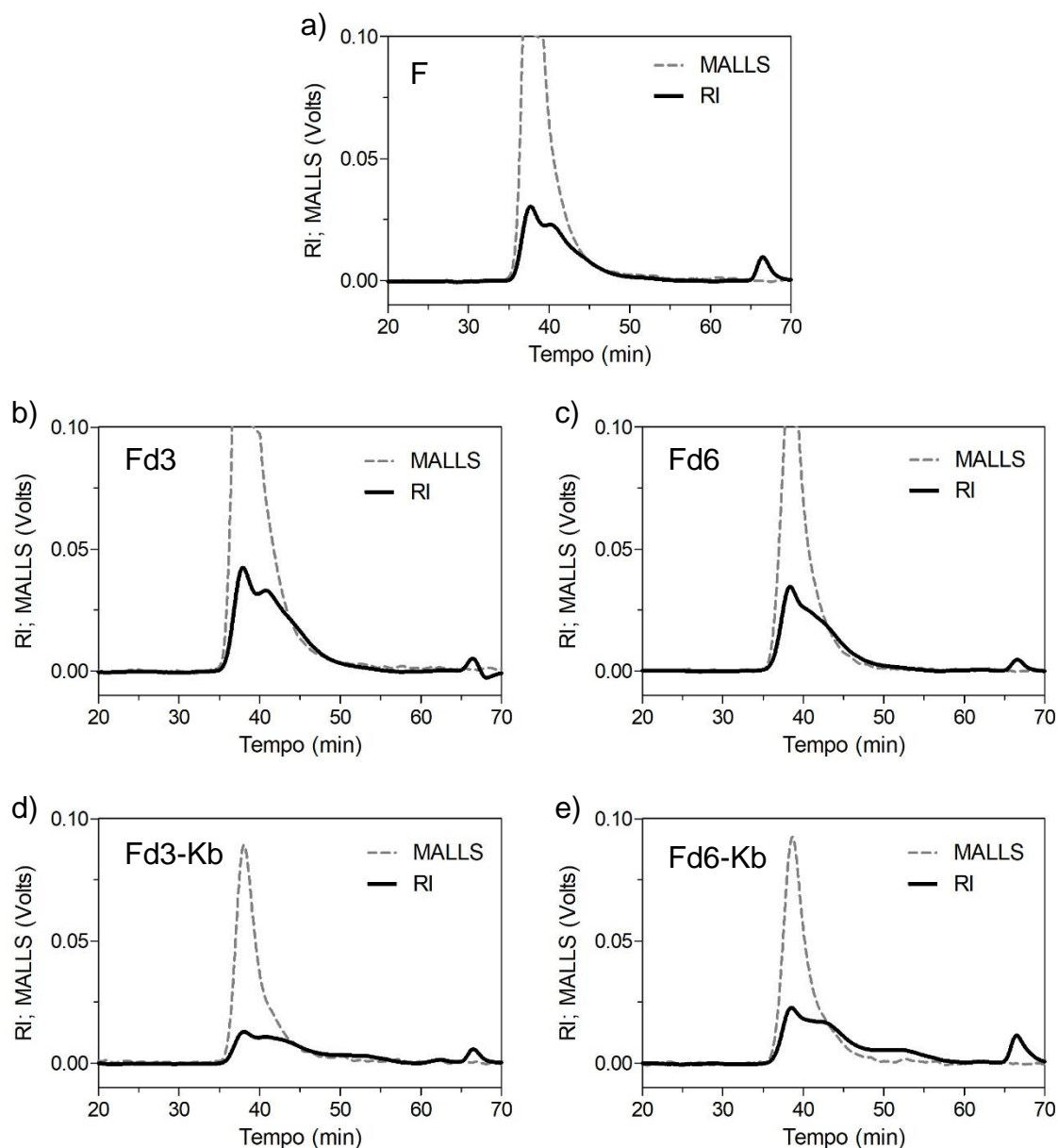
O cromatograma da fração Fd6-Kb, detectado por RI, também apresentou um perfil alargado e detecção por MALLS (90°) em ~40 minutos (FIGURA 46e). A ulvana-amida híbrida Fd6-Kb apresentou dispersão igual a 2,3, sendo menor que a da fração Fd3-Kb. As dispersões apresentadas pelos polissacarídeos híbridos são condizentes com as dispersões calculadas para as frações originais, Fd3 e Fd6, pois Fd3 (\bar{D} =1,9) também apresentou dispersão maior que Fd6 (\bar{D} =1,6).

Observou-se que os polissacarídeos híbridos apresentaram distribuições de massas semelhantes ao polissacarídeo original F e mostraram uma discreta expansão da distribuição de massa em aproximadamente 50 minutos (FIGURA 46a, d e e).

7.8.3 Espectroscopia de RMN das frações Fd3-Kb e Fd6-Kb

A fração Fd3-Kb foi obtida a partir da reação de aminação redutiva conduzida com a ulvana-amida Fd3 e a *kappa*-carrabiose Kb. O espectro de HSQC-editado da fração Fd3-Kb (FIGURA 47a) mostrou, em fase negativa, os grupos -CH₂- presentes neste polissacarídeo híbrido. Foi possível identificar os três grupos -CH₂- da diamina DAP ligada à ulvana via amidação e ligada à *kappa*-carrabiose via aminação redutiva, sendo eles identificados, da extremidade amida para a extremidade amina, respectivamente, pelas correlações centradas em (1') 37,4/3,36, (2') 26,4/1,98 e (3') 46,7/3,14 ppm, conforme a FIGURA 47a.

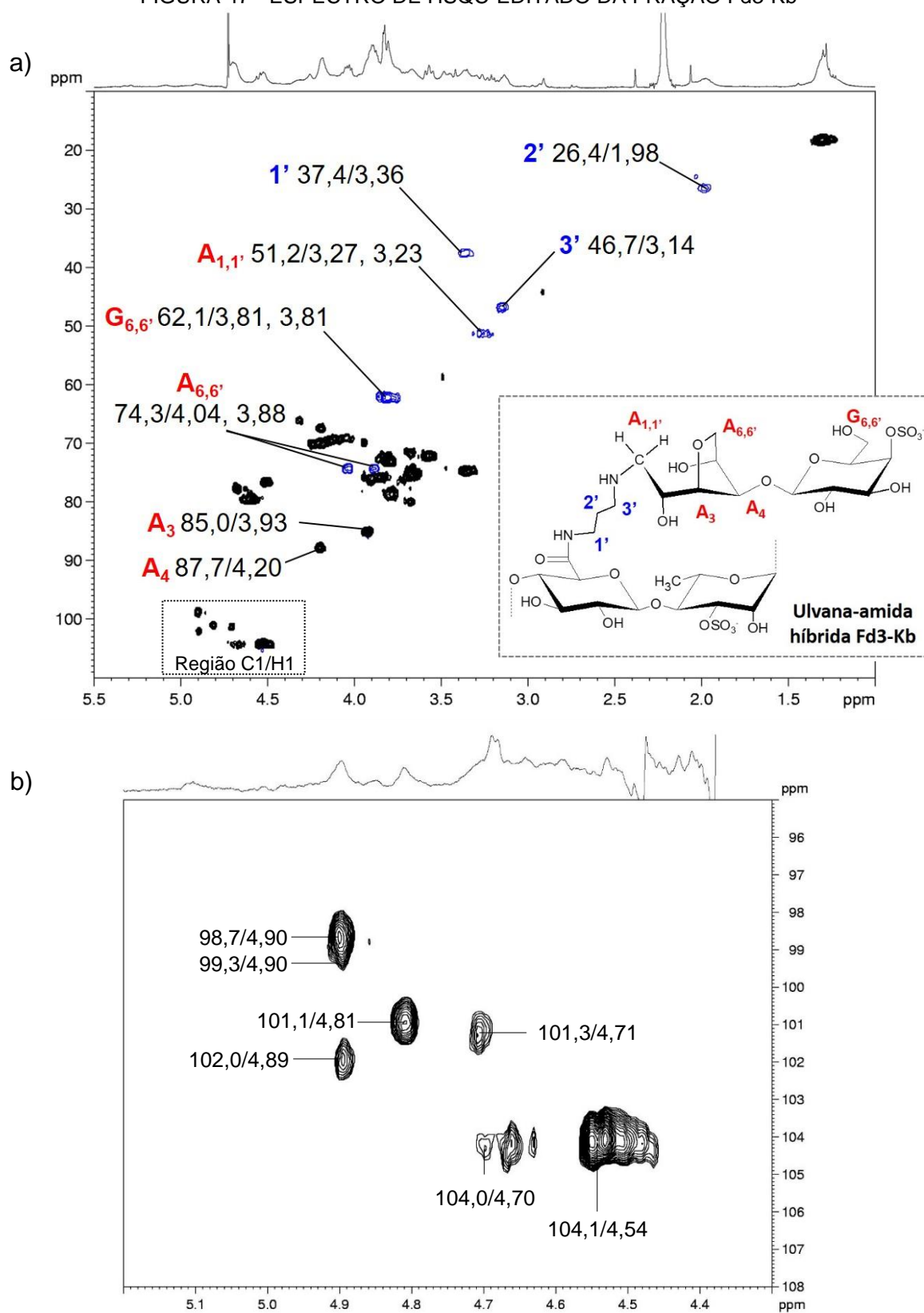
FIGURA 46 - CROMATOGRAMAS DE HPSEC-MALLS-RI DA ULVANA NATIVA F ISOLADA DE *U. fasciata* E DAS ULVANAS-AMIDA Fd3, Fd6, Fd3-Kb e Fd6-Kb



Cromatogramas de HPSEC-MALLS-RI com o detector MALLS (90°) e índice de refração (RI) plotados em relação ao tempo de retenção (min). Frações a) F, b) Fd3, c) Fd6, d) Fd3-Kb e e) Fd6-Kb. FONTE: O autor (2017).

Os dois sinais diagnósticos da ligação C-N formada durante a aminação redutiva com DAP, incluíram: (1) a correlação em (3') 46,7/3,14 ppm referente ao C3'/H3' da extremidade amina de 1,3-diaminopropano ligada à *kappa*-carrabiose e (2) a correlação em (K) 51,2/3,27, 3,23 ppm, também invertida pelo experimento de HSQC-editado, a qual foi atribuída aos C1/H1,1' das unidades de 3,6-anidrogactose da *kappa*-carrabiose, reduzida durante a aminação redutiva (FIGURA 47a).

FIGURA 47 - ESPECTRO DE HSQC-EDITADO DA FRAÇÃO Fd3-Kb



a) Espectro de HSQC-EDITADO da fração Fd3-Kb obtida da aminação reductiva de Kb na presença da ulvana-amida Fd3, correlações negativas em azul; b) inserto da região anomérica do espectro de HSQC-EDITADO da fração Fd3-Kb (C1/H1). Solvente: D₂O, 30 °C; padrão interno acetona (31,45 e 2,225 ppm). Fonte: O autor (2017).

Adicionalmente, no espectro de HSQC-editado da fração Fd3-Kb, as correlações invertidas em (X) 62,1/3,81, 3,81 e (Z) 74,3/4,04, 3,88 ppm foram atribuídas, respectivamente, aos C6/H6,6' das unidades de β -D-galactose 4-sulfato e 3,6-anidrogactose (Miller *et al.*, 1982; Gonçalves *et al.*, 2005) (FIGURA 47). Os outros carbonos e hidrogênios das unidades de β -D-galactose 4-sulfato e 3,6-anidrogactose foram identificados na fase positiva do espectro de HSQC-editado, o qual também mostrou as correlações referentes às díades da ulvana-amida Fd3 (FIGURA 47a).

A análise da região anomérica do espectro de HSQC-editado da fração Fd3-Kb (FIGURA 47b) permitiu identificar na correlação em 104,1/4,54 ppm os C1/H1 das unidades de β -D-galactose 4-sulfato, do dissacarídeo de *kappa*-carragenana (Gonçalves *et al.*, 2005). A ulvana pôde ser identificada pelas correlações em 98,7/4,90, 99,3/4,90, 101,1/4,81 e 102,0/4,89 ppm, as quais referem-se aos C1/H1 das unidades de α -L-ramnose 3-sulfato das díades U_{3S}, U_{2',3S}, A_{3S} e B_{3S}, respectivamente (Lahaye, 1998; Lahaye *et al.*, 1997; Lahaye *et al.*, 1998) (FIGURA 47b).

O C1/H1 das unidades de α -L-ramnose 3-sulfato ligadas ao ácido β -D-glucurônico modificado foram atribuídas a correlação em 101,3/4,71 ppm, enquanto a correlação em 104,0/4,70 ppm foi atribuída ao C1/H1 das unidades de ácido β -D-glucurônico amidado (FIGURA 47b). O espectro de HSQC-editado da fração Fd3-Kb não mostrou correlação para os carbonos e hidrogênios das unidades de ácido α -L-idurônico (FIGURA 47a).

Na região de C2/H2 a C6/H6 do espectro de HSQC-editado da fração Fd3-Kb foi possível identificar a correlação em 67,5/4,19 ppm, atribuída ao C2/H2 das unidades de 3,6-anidrogactose da fração Kb, reduzida durante a aminação redutiva. As correlações referentes aos C3/H3 e C4/H4 das unidades de 3,6-anidrogactose da fração Fd3-Kb sofrem deslocamento quando comparadas às unidades de 3,6-anidrogactose da *kappa*-carrabiitol. De acordo com a calibração em 31,45/2,225 ppm para acetona utilizada para as ulvanas, os C3/H3 e C4/H4 das unidades de 3,6-anidrogactose da *kappa*-carrabiitol são identificados, respectivamente, pelas correlações em 84,9/3,91 e 88,4/4,17 ppm. Já na fração Fd3-Kb os C3/H3 e C4/H4 das unidades de 3,6-anidrogactose foram identificados pelas correlações em 85,0/3,93 e 87,7/4,20 ppm, respectivamente (Gonçalves *et al.*, 2005).

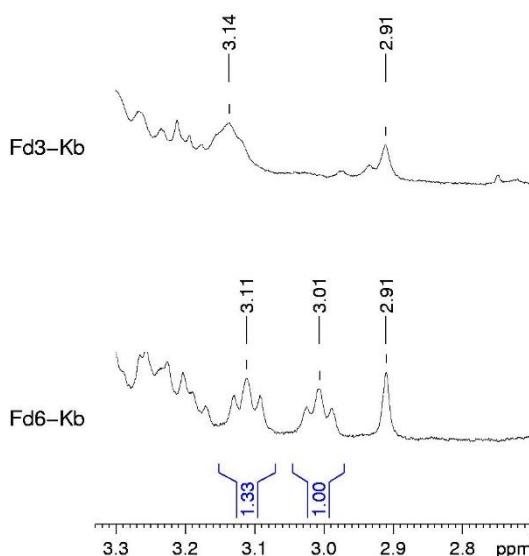
No espectro de HSQC-editado da fração Fd3-Kb, a integração das áreas referentes aos C1/H1 das unidades de α -L-ramnose 3-sulfato ligadas às unidades de

ácido β -D-glucurônico e ácido β -D-glucurônico amidado, 101,1/4,81 e 101,3/4,71 ppm, respectivamente, corresponde à mesma proporção encontrada para a fração Fd3. Assim, tanto Fd3 quanto Fd3-Kb mostram uma proporção de 54-58% de unidades ácido β -D-glucurônico para 48-42% de unidades ácido β -D-glucurônico modificados.

A análise do espectro de RMN de ^1H da fração Fd3-Kb (FIGURA 48) permitiu identificar o sinal (triplete) centrado em 3,14 ppm, referente aos hidrogênios metilênicos de *N*-(3'-aminopropil)-amida 3'-ligados à Kb. Adicionalmente, Fd3-Kb não apresentou sinal (triplete) centrado em 3,05 ppm, referente aos hidrogênios metilênicos C3'/H3' da extremidade livre de *N*-(3'-aminopropil)-amida. Desta forma, considerou-se que todas as extremidades amino livres, inseridas na ulvana via amidação, foram ligadas ao C1 das unidades de *kappa*-carrabiose via aminação redutiva. Portanto, todas as unidades amidadas foram ligadas à Kb, tendo-se, aproximadamente, para cada 4 unidades de ácido β -D-glucurônico 3 unidades de ácido β -D-glucurônico ligado a *kappa*-carrabiose.

A fração Fd6-Kb foi obtida a partir da reação de aminação redutiva conduzida com a ulvana-amida Fd6 e a *kappa*-carrabiose (Kb). O espectro de RMN de ^1H da fração Fd6-Kb (FIGURA 48) apresentou os sinais (tripletes) centrados em 3,11 ppm, referentes aos hidrogênios metilênicos da extremidade H6' da diamina HMD ligada à Kb e em 3,01 ppm aos hidrogênios metilênicos H6' da diamina HMD livre.

FIGURA 48 - INTEGRAÇÕES DOS ESPECTROS DE RMN DE ^1H DAS FRAÇÕES Fd3-Kb E Fd6-Kb



Solvente: D_2O , 30 °C; padrão interno acetona (31,45 e 2,225 ppm). FONTE: O autor (2017).

Em comparação à fração Fd3-Kb, a FIGURA 48 mostra a integração do espectro de RMN de ^1H da fração Fd6-Kb na região de 2,7 a 3,3 ppm, de onde pôde-se determinar que cerca de 58% das extremidades amina do grupo *N*-(6'-aminohexil)-amida da fração Fd6-Kb sofreram aminação redutiva.

No espectro de HSQC a fração Fd6-Kb (FIGURA 49b) foi possível identificar os seis grupos $-\text{CH}_2-$ da diamina HMD ligada à ulvana via amidação e ligada à *kappa*-carrabiose via aminação redutiva, sendo eles identificados, da extremidade amida ($\text{C1}'/\text{H1}'$) para a extremidade amina ($\text{C6}'/\text{H6}'$), respectivamente, pelas correlações centradas em (1') 40,5/3,25, (2') 29,1/1,55, (3') 26,5/1,38, (4') 26,4/1,71, (5') 27,7/1,65 e (6' livre) 40,7/3,01 ou (6' ligado) 49,1/3,11 ppm, conforme a FIGURA 49b.

Os dois sinais diagnósticos da ligação C-N formada durante a aminação redutiva com HMD, incluíram: (1) a correlação em (F) 49,1/3,11 ppm referente aos $\text{C6}'/\text{H6}'$ da extremidade amina de HMD ligada à *kappa*-carrabiose e (2) a correlação em (K) 51,2/3,24, 3,18 ppm, a qual foi atribuída aos $\text{C1}/\text{H1}, 1'$ das unidades de 3,6-anidrogactose da *kappa*-carrabiose, reduzida durante a aminação redutiva (FIGURA 49b). Assim, como para a fração Fd3-Kb, os sinais diagnósticos da fração Fd6-Kb, bem como as correlações identificadas como $-\text{CH}_2-$ na FIGURA 49, também foram invertidos por HSQC-editado (FIGURA 49a).

Muito semelhante à da fração Fd3-Kb, a região de $\text{C2}/\text{H2}$ a $\text{C6}/\text{H6}$ do espectro de HSQC-editado da fração Fd6-Kb (FIGURA 49c) permitiu identificar $\text{C2}/\text{H2}$ das unidades de 3,6-anidrogactose pela correlação em 67,3/4,17 ppm, além das correlações referentes aos $\text{C3}/\text{H3}$, $\text{C4}/\text{H4}$, $\text{C5}/\text{H5}$ e $\text{C6}/\text{H6}, 6'$ da mesma unidade, respectivamente, em 85,2/3,91, 87,7/4,19, 76,7/4,51 e 74,3/4,02, 3,87 ppm. As unidades de β -D-gactose 4-sulfato foram identificadas pelas correlações em 72,1/3,55, 73,0/3,78, 77,7/4,68, 76,0/3,87 e 62,1/3,81, 3,81 ppm, referente, respectivamente, aos $\text{C2}/\text{H2}$, $\text{C3}/\text{H3}$, $\text{C4}/\text{H4}$, $\text{C5}/\text{H5}$ e $\text{C6}/\text{H6}, 6'$ desta unidade sulfatada (Gonçalves *et al.*, 2005).

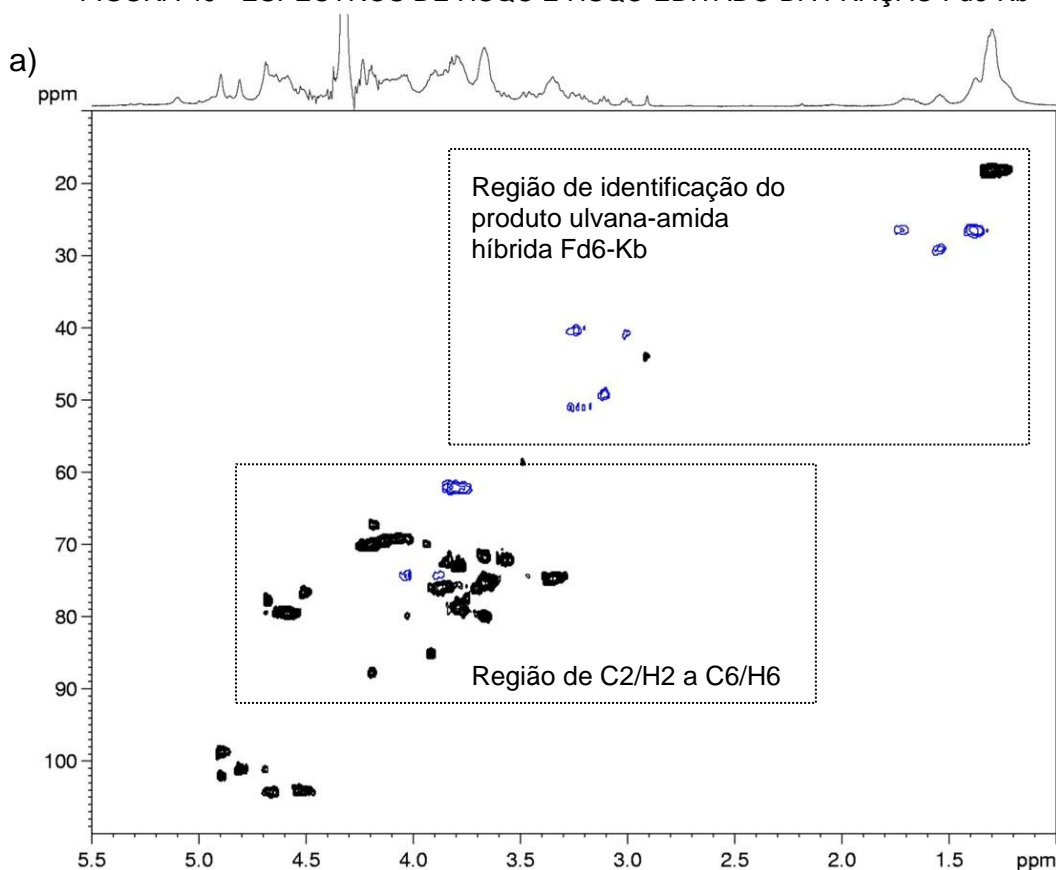
As regiões referentes aos $\text{C2}/\text{H2}$, $\text{C3}/\text{H3}$, $\text{C4}/\text{H4}$ e $\text{C5}/\text{H5}$ das unidades de α -L-ramnose 3-sulfato e ácido β -D-glucurônico também foram identificadas pelo espectro de HSQC-editado da fração Fd6-Kb, bem como $\text{C2}/\text{H2}$, $\text{C3}/\text{H3}$ e $\text{C4}/\text{H4}$ das unidades de β -D-xilose e $\text{C2}/\text{H2}$ e $\text{C3}/\text{H3}$ das unidades de ácido α -L-idurônico (Lahaye, 1998; Lahaye *et al.*, 1997; Lahaye *et al.*, 1998) (FIGURA 49c).

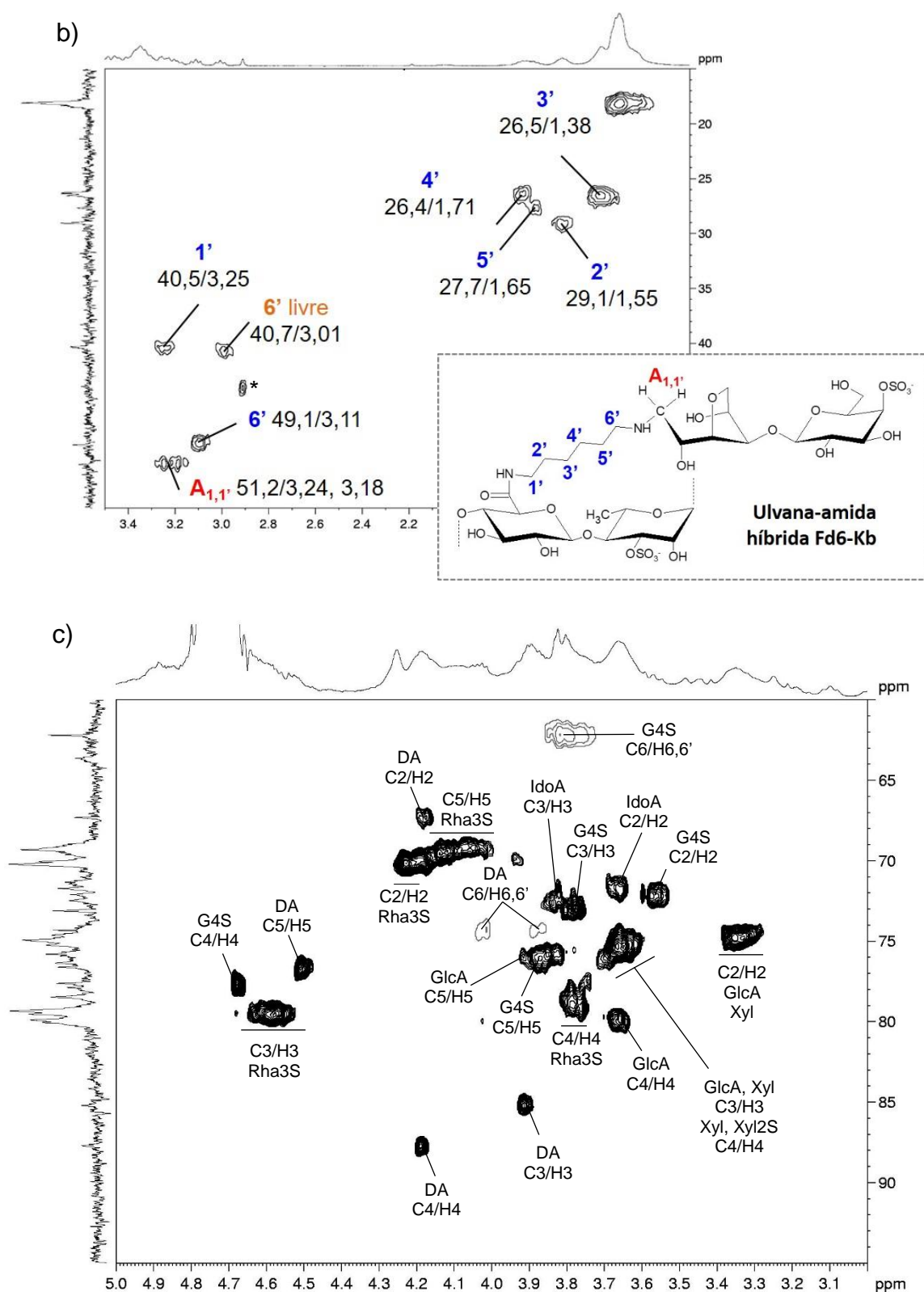
A análise da região anomérica do espectro de HSQC-editado da fração Fd6-Kb permitiu identificar na correlação em 104,1/4,53 ppm os $\text{C1}/\text{H1}$ das unidades de β -

D-galactose 4-sulfato, do dissacarídeo de *kappa*-carragenana (Gonçalves *et al.*, 2005). As correlações referentes às unidades de α -L-ramnose 3-sulfato das díades U_{3S} , $U_{2',3S}$, A_{3S} e B_{3S} da ulvana também foram identificadas, assim como para a fração Fd3-Kb (Lahaye, 1998; Lahaye *et al.*, 1997; Lahaye *et al.*, 1998).

O espectro de HSQC-editado da fração Fd6-Kb (região não mostrada) também permitiu identificar o C1/H1 das unidades de α -L-ramnose 3-sulfato ligadas ao ácido β -D-glucurônico (101,1/4,81 ppm) e ao ácido β -D-glucurônico amidado (101,2/4,69 ppm). A integração destas regiões do espectro mostrou que a proporção de unidades de ácido β -D-glucurônico e ácido β -D-glucurônico amidado é mantida em relação à encontrada para a fração Fd6, sendo igual a 75-80 e 25-20%, respectivamente.

FIGURA 49 - ESPECTROS DE HSQC E HSQC-EDITADO DA FRAÇÃO Fd6-Kb





a) Espectro de HSQC-editado da fração Fd6-Kb obtida da aminação redutiva de Kb na presença da ulvana-amida Fd6, correlações negativas em azul; b) inserto da região do espectro de HSQC da fração Fd6-Kb que identifica a ulvana-amida híbrida; c) inserto da região de C2/H2 a C6/H6 do espectro de HSQC da fração Fd6-Kb. Correlação referente ao intermediário O-acetato (*). Solvente: D₂O, 30 °C; padrão interno acetona (31,45 e 2,225 ppm). Fonte: O autor (2017).

Considerando-se que dos 20 a 25% de unidades de ácido β -D-glucurônico amidado presentes na fração Fd6-Kb, aproximadamente, 58% sofreram aminação redutiva, pôde-se estimar que 13% das unidades de ácido β -D-glucurônico formaram ligações C-N com os dissacarídeos de *kappa*-carragenana.

Os dados apresentados neste item mostraram que as ulvanas são polissacarídeos passíveis de serem funcionalizados via reações de amidação utilizando diferentes tipos de amins, podendo ainda, produzir polímeros com diferentes graus de amidação dependendo do pH do meio reacional e da adição de diferentes equivalentes de EDC e NHS.

A inserção dos grupos amino às ulvanas possibilitou, através de aminação redutiva, adicionar moléculas redutoras, à exemplo da *kappa*-carrabiose. O processo de otimização das reações de aminação redutiva da ulvana-amida Fd3 com *kappa*-carrabiose demonstrou a possibilidade de promover as ligações covalentes em meios reacionais compostos por água/metanol nas proporções 1:3, 1:1 e 1:0.

Destaca-se, ainda, que utilizando uma condição de aminação redutiva em meio aquoso, sem adição de solvente, foi possível promover a ligação de todas as extremidades *N*-(3'-aminopropil)-amida da ulvana-amida Fd3 à κ -carrabiose, resultando no polissacarídeo híbrido Fd3-Kb, que se apresentou aproximadamente 46% híbrido.

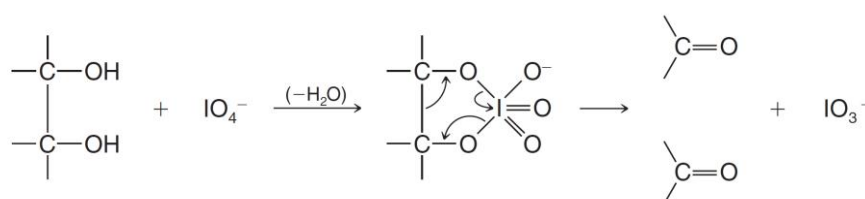
As reações de amidação e semissíntese de polissacarídeos híbridos via aminação redutiva permitiram a obtenção de 5 derivados inéditos de ulvanas, sendo 3 derivados ulvana-amida (Fd5m, Fd3 e Fd6) e 2 polissacarídeos híbridos-amida (Fd3-Kb e Fd6-Kb). Assim, as ulvanas constituem macromoléculas que apresentam grande potencial para modificações químicas e para produção de novas moléculas e biomateriais, os quais podem ser aplicados em diferentes áreas biotecnológicas.

7.9 PROCESSO DE REAÇÃO SEQUENCIAL DE OXIDAÇÃO-AMINAÇÃO REDUTIVA DA ULVANA DE *Ulva fasciata*

O presente item discute a inserção de grupos amino à ulvana via oxidação de C2 e C3 das unidades monossacarídicas com *m*-periodato de sódio. O processo de oxidação resultou na formação de grupos aldeído, os quais foram submetidos à aminação redutiva com as diaminas 1,3-diaminopropano e 1,6-diaminoexano.

As reações de oxidação com *m*-periodato de sódio apresentam diferentes aplicações desde a sua descoberta em 1928. A reação de oxidação conduzida em um poliálcool acíclico forma dois compostos carbonílicos ao quebrar a ligação C-C entre as hidroxilas vicinais (FIGURA 50), enquanto um poliálcool cíclico forma um composto com duas carbonilas. Na oxidação de carboidratos os compostos carbonílicos formados geralmente constituem aldeídos, porque a oxidação ocorre em carbonos com hidroxilas vicinais secundárias (Guthrie, 1961).

FIGURA 50 - CLIVAGEM OXIDATIVA POR PERIODATO



FONTE: Solomons e Fryhle (2011).

A oxidação com periodato constitui um método clássico de determinação estrutural de carboidratos complexos, ou ainda da técnica de coloração de carboidratos em estruturas de tecidos em histologia e patologia, por meio do reagente PAS (*Periodic acid-Schiff*) (Guthrie, 1961; Kristiansen *et al.*, 2010).

Atualmente, as reações de oxidação com periodato têm despertado interesse no contexto das modificações químicas em polissacarídeos. Assim, a abordagem química da oxidação com periodato é utilizada para funcionalizar polissacarídeos ou ainda promover alterações de suas propriedades físico-químicas. As propriedades macromoleculares de polissacarídeos oxidados são modificadas em função das alterações na flexibilidade e extensão das cadeias polissacarídicas que promovem diferenças na solubilidade, cristalinidade e capacidade de interação intermolecular ou com outras biomoléculas (Vold e Christensen, 2005; Kristiansen *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010; Teotia, 2012; Coseri *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2013).

Neste trabalho, a reação de oxidação com periodato foi utilizada para formar sítios de inserção para as diaminas 1,3-diaminopropano e 1,6-diaminoexano. Assim, as diaminas foram adicionadas aos grupos aldeído formados via aminação redutiva. As reações foram conduzidas, de maneira que, ao final da reação de oxidação, foram adicionados ao meio reacional os reagentes para aminação redutiva. Assim, a reação sequencial de oxidação-aminação redutiva permitiu recuperar a ulvana aminada.

7.9.1 Ajuste das condições reacionais de oxidação-aminação redutiva

As reações de oxidação-aminação redutiva foram conduzidas com 1,3-diaminopropano e a ulvana F, como mostrado na TABELA 23, a fim de ajustar as condições reacionais para a obtenção do correspondente polímero aminado. Todas as reações foram realizadas em presença de n-propanol, capaz de consumir possíveis radicais livres formados em decorrência da decomposição do periodato, os quais podem promover a degradação do polissacarídeo (Kristiansen *et al.*, 2010).

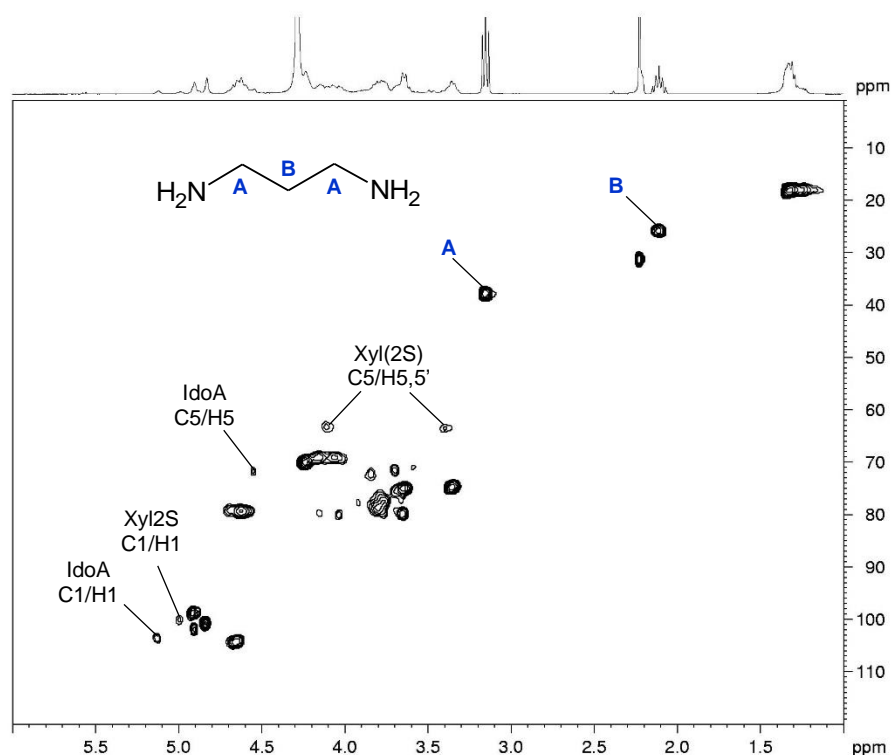
A primeira condição de oxidação realizada foi branda, conduzida com 50 mg da ulvana F solubilizados em água (0,25%) e n-propanol (0,20%), em presença de 18,7 mmol.L⁻¹ de NaIO₄ por 4 h à 0 °C (entrada 1, TABELA 23). Ao final da oxidação, seguiu-se a adição de etilenoglicol para consumir o excesso de periodato e então foram adicionados 236,6 mmol.L⁻¹ de 1,3-diaminopropano e 14 mmol.L⁻¹ de NaBH₃CN e o meio reacional foi mantido sob agitação por 13 h a 30 °C. Os polissacarídeos foram recuperados após diálise e liofilização. A FIGURA 51 mostra o espectro de HSQC do produto da reação da entrada 1 (TABELA 23).

TABELA 23 - CONDIÇÕES DAS REAÇÕES DE OXIDAÇÃO-AMINAÇÃO REDUTIVA DA ULVANA F OBTIDA DE *U. fasciata* COM 1,3-DIAMINOPROPANO (DAP)

Entrada	Oxidação			Aminação redutiva				Produto amina ^b (3,25 ppm)
	NaIO ₄ ^a (mmol.L ⁻¹)	Tempo (h)	Temp. (°C)	Tempo (h)	pH _{inicial}	pH _{final}	Temp. (°C)	
1	18,7	4	0	13	-	11	30	0
2	54,5	4	0	13	-	11	30	0
3	18,7	4	30	13	-	11	30	0
4	18,7	72	30	13	11	11	30	0
5	18,7	72	30	13	7,0	7,5	30	0,10
6	18,7	72	55	15	5,5	7,5	55	0,57

^a Equivalentes calculados em relação à massa teórica da ulvana F; ^b Relação entre as integrações dos sinais 4,83 e 3,25 ppm no espectro de RMN de ¹H, referentes, respectivamente, a H1 da unidade de α-L-ramnose da díade A_{3S} e do grupo N-aminopropil.

FIGURA 51 - ESPECTRO DE HSQC DO PRODUTO DA REAÇÃO SEQUENCIAL DE OXIDAÇÃO-AMINAÇÃO REDUTIVA



Espectro de HSQC do produto da reação de oxidação-aminação redutiva da entrada 1 (TABELA 23). Solvente: D₂O, 70 °C; padrão interno acetona (*) (31,45 e 2,225 ppm). FONTE: O autor (2017).

A análise do espectro de HSQC permitiu concluir que não houve oxidação ou aminação da ulvana, pois o espectro correspondeu à ulvana nativa, apresentando todos os sinais da ulvana F. Ainda, este espectro revelou a correlação em 71,8/4,55 ppm, referente aos C5/H5 das unidades de ácido α -L-idurônico. Esta correlação não havia sido identificada pelos experimentos de RMN realizados com a ulvana nativa. Ainda se observou que as correlações da região anomérica foram intensificadas para os C1/H1 das unidades de ácido α -L-idurônico (103,5/5,12 ppm) e β -D-xilose 2-sulfato (100,2/4,99 ppm), bem como para os C5/H5,5' das unidades de β -D-xilose (2-sulfato) (63,3/4,10; 3,36 ppm), quando comparadas à fração nativa F (FIGURA 28) (Lahaye, 1998; Lahaye *et al.*, 1998). Adicionalmente, também foram identificadas as correlações em 37,7/3,15 e 25,9/2,11 ppm, referentes, respectivamente, a C1/H1, C3/H3 (A) e C2/H2 (B) da 1,3-diaminopropano livre (FIGURA 51), os quais foram assinalados de acordo com os experimentos de RMN realizados com a diamina livre (TABELA 17). Estes resultados indicaram que a amina não foi removida por diálise simples, tendo sido necessário adicionar o procedimento

de diálise contra NaCl 1 mol.L⁻¹, seguida de diálise contra água destilada novamente para remoção da amina livre no meio reacional.

Tendo em vista que a ulvana não foi aminada porque não houve oxidação, a reação da entrada 2 (TABELA 23) foi conduzida com 54,5 mmol.L⁻¹ de NaIO₄. A análise do espectro de RMN de ¹H após as etapas de oxidação-aminação identificou a diminuição da intensidade dos sinais referentes à β-D-xilose (H3 e H4 em 3,67 ppm e H2 em 3,36 ppm) (Lahaye, 1998). Na região anomérica, também foi observada a diminuição do sinal de H1 de α-L-ramnose 3-sulfato ligada a β-D-xilose (4,91 ppm) (Lahaye, 1998), indicando que a α-L-ramnose 3-sulfato não está mais ligada à unidade intacta de β-D-xilose. O espectro de ¹H do produto da reação da entrada 2 está representado na FIGURA 52 e destaca com seta o sinal em 4,91 ppm.

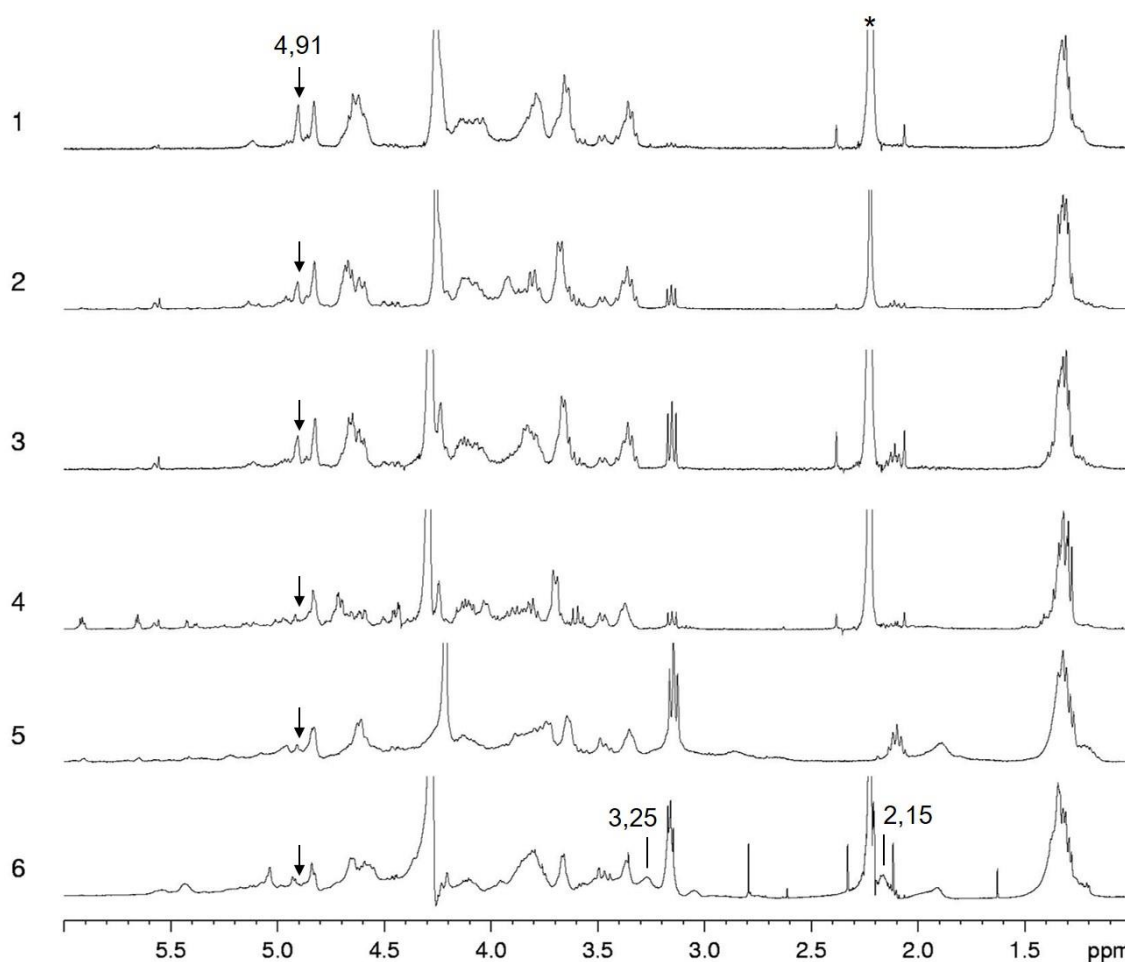
A diminuição da intensidade dos sinais referentes à β-D-xilose ou à α-L-ramnose 3-sulfato ligada a β-D-xilose no produto da entrada 2 (TABELA 23) indica que ocorreu oxidação das unidades de β-D-xilose, pois as unidades monossacarídicas de β-D-xilose apresentam hidroxilas vicinais capazes de formar complexo com o íon periodato e sofrer clivagem das ligações C2-C3.

Assim, para aumentar o grau de oxidação, a reação da entrada 3 (TABELA 23) foi realizada com 18,7 mmol.L⁻¹ de NaIO₄ a 30 °C. No entanto, o aumento da temperatura não resultou num aumento considerável da oxidação pois a intensidade do sinal em 4,91 ppm ainda permaneceu alta (FIGURA 52).

Sequencialmente foi alterado o tempo de reação de oxidação para 72 h (entrada 4, TABELA 23) considerando que além da presença de unidades resistentes à oxidação com periodato, como α-L-ramnose 3-sulfato e β-D-xilose 2-sulfato presentes na ulvana, também pode ocorrer o retardamento da oxidação em função da formação de hemiacetais intracadeias entre os monossacarídeos de regiões que já sofreram clivagem com os de regiões intactas (Fransson, 1974; Lindberg *et al.*, 1975).

O espectro de ¹H do produto da reação da entrada 4 mostrou que houve oxidação das unidades de β-D-xilose, tendo em vista a diminuição da intensidade do sinal em 4,91 ppm (FIGURA 52). A partir desta reação foi incluída no protocolo reacional a verificação dos valores de pH inicial e final das reações de aminação redutiva. O pH inicial da reação da entrada 4 foi igual a 11 em função da presença da 1,3-diaminopropano (valores de pka iguais a 9,5 e 10,6) no meio reacional. Neste pH a diamina encontra-se predominantemente na forma protonada, o que dificulta a formação das ligações C-N.

FIGURA 52 - ESPECTROS DE RMN DE ^1H DOS PRODUTOS DAS REAÇÕES DE OXIDAÇÃO-AMINAÇÃO REDUTIVA DA ULVANA F UTILIZANDO 1,3-DIAMINOPROPANO (DAP)



Setas indicam o sinal em 4,91 ppm. Os números 1 a 6 indicam as entradas reacionais da TABELA 23. Os sinais em 3,25 e 2,15 ppm referem-se ao produto ulvana-amina. Solvente: D_2O , 70 °C; padrão interno acetona (*) (31,45 e 2,225 ppm). FONTE: O autor (2017).

Assim, na reação da entrada 5 (TABELA 23) manteve-se a condição de oxidação anterior (entrada 4, TABELA 23) e no início da reação de aminação redutiva o pH foi ajustado para 7,0 com HCl. A análise do espectro de HSQC (espectro não mostrado) do produto desta reação apresentou a correlação, de baixa intensidade, em 46,2/3,25 ppm, a qual foi atribuída aos C2/H2 e C3/H3 das unidades oxidadas por periodato e reduzidas pelo 1,3-diaminopropano durante a etapa de aminação redutiva. Este assinalamento foi realizado com auxílio das análises de RMN realizadas para as reações de aminação redutiva posteriores às reações de amidação (página 149) e estão de acordo com a literatura (Silverstein *et al.*, 2007).

O pH do meio reacional foi alterado para 5,5 no início da etapa de aminação redutiva e utilizou-se a temperatura de 55 °C com a finalidade de incrementar a aminação redutiva (entrada 6, TABELA 23). O espectro de HSQC do produto da reação 6 (espectro não mostrado) também apresentou a correlação em 46,5/3,26 ppm (C2/H2 e C3/H3 das unidades oxidadas), bem como as correlações em 38,2/3,16, 24,2/2,15 e 38,6/3,05 ppm, respectivamente, referentes aos C1'/H1', C2'/H2' e C3'/H3' do grupo *N*-3'-aminopropil. O espectro de ¹H do produto da reação 6 (FIGURA 52) destaca os sinais em 3,25 e 2,15 ppm, diagnósticos da reação de aminação redutiva.

Desta forma, as condições estabelecidas na entrada 6 (TABELA 23) foram utilizadas para as reações preparativas de oxidação-aminação redutiva da ulvana com as diaminas, tendo sido realizadas a 55 °C com 72 h de oxidação (18,7 mmol.L⁻¹ de NaIO₄ e 236,6 mmol.L⁻¹ de 1,3-diaminopropano ou 261,2 mmol.L⁻¹ de 1,6-diaminoexano) com ajuste do pH inicial da aminação redutiva para 5,0 com HCl, originando as frações Fn3 e Fn6.

7.10 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES ULVANAS-AMINA Fn3 E Fn6

7.10.1 Análises químicas das frações Fn3 e Fn6

A fração Fn3 apresentou recuperação menor que Fn6 e ambas tiveram rendimentos diminuídos (TABELA 24) em relação às frações modificadas via amidação (TABELA 18, página 130).

TABELA 24 - RECUPERAÇÃO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES Fn3 E Fn6 OBTIDAS POR OXIDAÇÃO-AMINAÇÃO REDUTIVA DA ULVANA DE *U. fasciata*

Frações	Recuperação ^a (%)	Carboidrato ^b (%)	Sulfato ^c (%)	Urônicos ^d (%)	Proteína ^e (%)	Nitrogênio ^f (%)	[α] ^{Dg} (°)
F ^h	-	72,4	21,2	21,9	1,3	0,61	- 75,5
Fn3	23,4	56,9	25,4	17,2	3,6	3,00	- 65,3
Fn6	55,0	54,9	28,5	13,1	1,8	2,78	- 71,1

^a Recuperação em relação a massa de material submetido a modificação; ^{b, c, d, e} Determinações de acordo com os métodos de Dubois *et al.* (1956), Dodgson e Price (1962), Filisetti-Cozzi e Carpita (1991) e Lowry *et al.* (1951), respectivamente; ^f Análise elementar de N em g% (m/m); ^g Rotação óptica específica, determinada a 20 °C em solução aquosa 0,2% (m/v); ^h Fração incluída para fins comparativos.

Como esperado a dosagem de carboidratos totais para Fn3 e Fn6 resultou em menores porcentagens de carboidratos quando comparadas à fração original F em função da oxidação de unidades monossacarídicas. Os valores de proteína e sulfato também sofreram algumas variações. As porcentagens de sulfato aumentaram em aproximadamente 20 e 30% nas frações Fn3 e Fn6, respectivamente (TABELA 24).

A oxidação com periodato promove a clivagem das ligações C-C entre hidroxilas vicinais. Desta forma, as unidades monossacarídicas com hidroxilas vicinais nas posições axial-axial ou unidades que não possuem hidroxilas vicinais são resistentes à oxidação. No caso das ulvanas, constituídas por cadeias 1,4-ligadas, as unidades substituídas por sulfato, como α -L-ramnose 3-sulfato e β -D-xilose 2-sulfato, mostraram-se inacessíveis à oxidação e, portanto, houve o aumento relativo das porcentagens de sulfato para as frações Fn3 e Fn6 (TABELA 24).

As porcentagens de ácidos urônicos mostraram-se diminuídas para ambas as frações oxidadas-aminadas, com um decréscimo de 20 e 40% para Fn3 e Fn6, respectivamente (TABELA 24). As unidades de ácido urônico possuem hidroxilas vicinais e podem ser oxidadas via periodato.

O conteúdo de nitrogênio das frações oxidadas-aminadas Fn3 e Fn6 foi maior que para as frações original F (TABELA 24) ou amidadas, Fd3 e Fd6 (TABELA 18, página 130). Esta observação corrobora com o fato de que durante a oxidação, cada unidade oxidada gera dois grupos aldeído. Portanto, houve aumento no consumo de diaminas durante as reações de oxidação-aminação redutiva quando comparado ao consumo das diaminas nas reações de amidação via EDC, conduzidas para obter as frações Fd3 e Fd6 (página 129).

As propriedades ópticas das ulvanas não sofrem grandes alterações após o processo de oxidação-aminação redutiva, tendo em vista a pequena diminuição dos valores absolutos de rotação óptica específica para as frações Fn3 e Fn6 quando comparadas à fração original F (TABELA 24).

O processo de oxidação com periodato influencia a estabilidade dos polissacarídeos, de forma que os derivados aldeído tornam-se mais suscetíveis à β -eliminação, resultando em despolimerização do polímero. Adicionalmente, pode ocorrer degradação do polissacarídeo por meio de radicais gerados no meio reacional, provenientes da decomposição do periodato (Kristiansen *et al*, 2010).

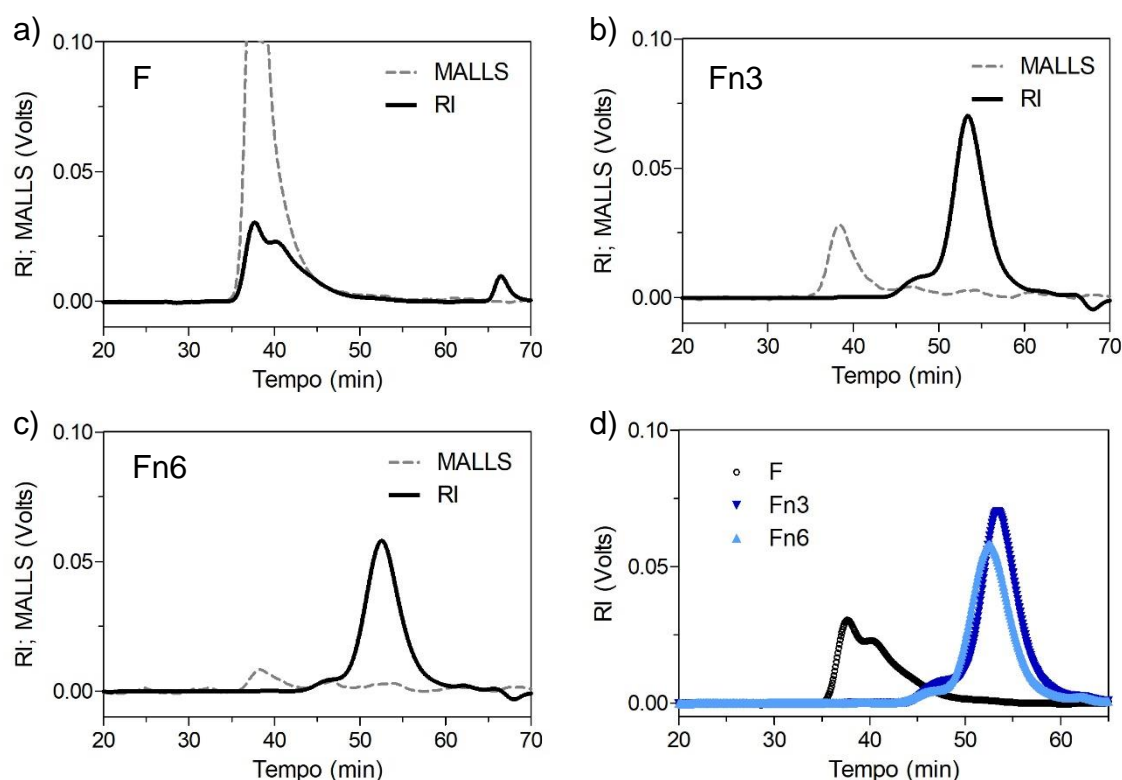
Por estes motivos foi adicionado n-propanol às reações de oxidação-aminação redutiva e os balões com a mistura reacional foram isolados da luz durante

a oxidação. No entanto, as frações Fn3 e Fn6 parecem ter sofrido despolimerização parcial. Com a finalidade de avaliar se o processo de oxidação-aminação ocasionou despolimerização das frações Fd3 e Fd6, elas foram analisadas quanto ao seu perfil cromatográfico por HPSEC-MALLS-RI.

7.10.2 Análise de HPSEC-MALLS-RI das frações Fn3 e Fn6

Os perfis cromatográficos de HPSEC-MALLS-RI, das frações Fn3 e Fn6 mostraram que após as reações de oxidação-aminação redutiva permaneceram baixas concentrações de fragmentos de maior massa molar, os quais foram identificados pelo detector MALLS (90°) em aproximadamente 40 minutos (FIGURA 53b e c).

FIGURA 53 - CROMATOGRAMAS DE HPSEC-MALLS-RI DA ULVANA NATIVA F ISOLADA DE *U. fasciata* E DAS ULVANAS-AMINA Fn3 e Fn6 E HPSEC-RI DAS FRAÇÕES F, Fn3 E Fn6



Cromatogramas de HPSEC-MALLS-RI com o detector MALLS (90°) e índice de refração (RI) plotados em relação ao tempo de retenção (min) das frações F (a), Fn3 (b) e Fn6 (c). Cromatogramas de HPSEC-RI comparativos entre as frações F, Fn3 e Fn6 (d). FONTE: O autor (2017).

No entanto, estes fragmentos de maior massa representaram uma baixa proporção dos polissacarídeos recuperados após a oxidação-aminação redutiva, pois o principal pico detectado pelo RI foi identificado em aproximadamente 53 minutos (FIGURA 53b e c). As massas molares médias ponderais (M_w) relativas das frações Fn3 e Fn6 foram de 71.082 e 75.552 g.mol⁻¹, respectivamente.

Os perfis cromatográficos detectados por RI, das frações Fn3 e Fn6, demonstraram o grau de despolimerização que as reações de oxidação-aminação redutiva promoveram em Fn3 e Fn6 quando comparadas à fração original F (FIGURA 53d). De acordo com as massas molares ponderais médias (M_w) relativas de F, Fn3 e Fn6, os processos de oxidação-aminação redutiva reduziram em aproximadamente 66% a massa M_w da fração F, de maneira que as frações Fn3 e Fn6 representam 1/3 da massa de F. Também é possível inferir que não ocorreram interações entre as cadeias das ulvanas-amina, postos os menores valores de M_w obtidos.

7.10.3 Espectroscopia de RMN das frações Fn3 e Fn6

Em comparação com a reação de amidação das carboxilas dos ácidos urônicos, a qual altera apenas o C6 dos monossacarídeos ácidos, as modificações químicas de polissacarídeos, realizadas por meio de reações de oxidação com periodato, acarretam extensas alterações na estrutura dos polímeros que apresentam hidroxilas vicinais suscetíveis à clivagem. Assim, por meio da análise dos espectros de RMN das frações Fn3 e Fn6 puderam ser detectadas as principais alterações estruturais da ulvana original F em relação às frações modificadas Fn3 e Fn6.

A fração Fn3 resultou da reação de oxidação-aminação redutiva da ulvana F em presença da 1,3-diaminopropano (DAP). O espectro de HSQC da fração Fn3 (FIGURA 54a) permitiu atribuir a correlação centrada em 46,0/3,21 ppm aos C2/H2 e C3/H3 das unidades oxidadas, os quais permanecem na forma de -CH₂- após aminação redutiva. Estes grupos -CH₂-, pertencentes às unidades que sofreram clivagem oxidativa, são representados por -CH₂- A e A' na FIGURA 54b. Adicionalmente, aos C1'/H1 e C3'/H3' da cadeia alquila proveniente de DAP (N-3'-aminopropil) foram atribuídas as correlações em 37,9/3,13 e 40,5/3,01 ppm, respectivamente. Na região de 23,0-30,0/1,20-2,30 ppm foram identificadas diferentes correlações para C2'/H2' em diferentes ambientes químicos (FIGURA 54b).

A análise da região anomérica do espectro de HSQC da fração Fn3 (FIGURA 54c) permitiu identificar que as regiões da ulvana resistentes à oxidação com periodato são compostas pelas díades de α -L-ramnose 3-sulfato ligadas ao ácido β -D-glucurônico (A_{3S}) e à β -D-xilose 2-sulfato ($U_{2,3S}$). As correlações referentes às díades dos tipos B_{3S} e U_{3S} não puderam ser identificadas no espectro, em função da oxidação das unidades de ácido α -L-idurônico e β -D-xilose.

As unidades de β -D-xilose encontram-se energeticamente estáveis na forma de cadeira 4C_1 , a qual apresenta as hidroxilas vicinais em posição equatorial-equatorial em C2 e C3, e, portanto, são passíveis de formar o intermediário cíclico com o íon periodato. Ao sofrer clivagem oxidativa cada um dos carbonos envolvidos formam um grupo aldeído (Solomons e Fryhle, 2002).

As unidades de ácido α -L-idurônico apresentam as hidroxilas de C2 e C3 em posição equatorial-equatorial quando na forma 4C_1 . No entanto, a cadeira 4C_1 não é energeticamente favorável para este monossacarídeo em função da substituição em C6 por ácido carboxílico. Desta forma, as unidades de ácido α -L-idurônico assumem a forma 2S_0 , uma estrutura torcida que estabiliza o substituinte iônico em C6, além de possibilitar a oxidação com periodato (Ochsenbein *et al.*, 2011).

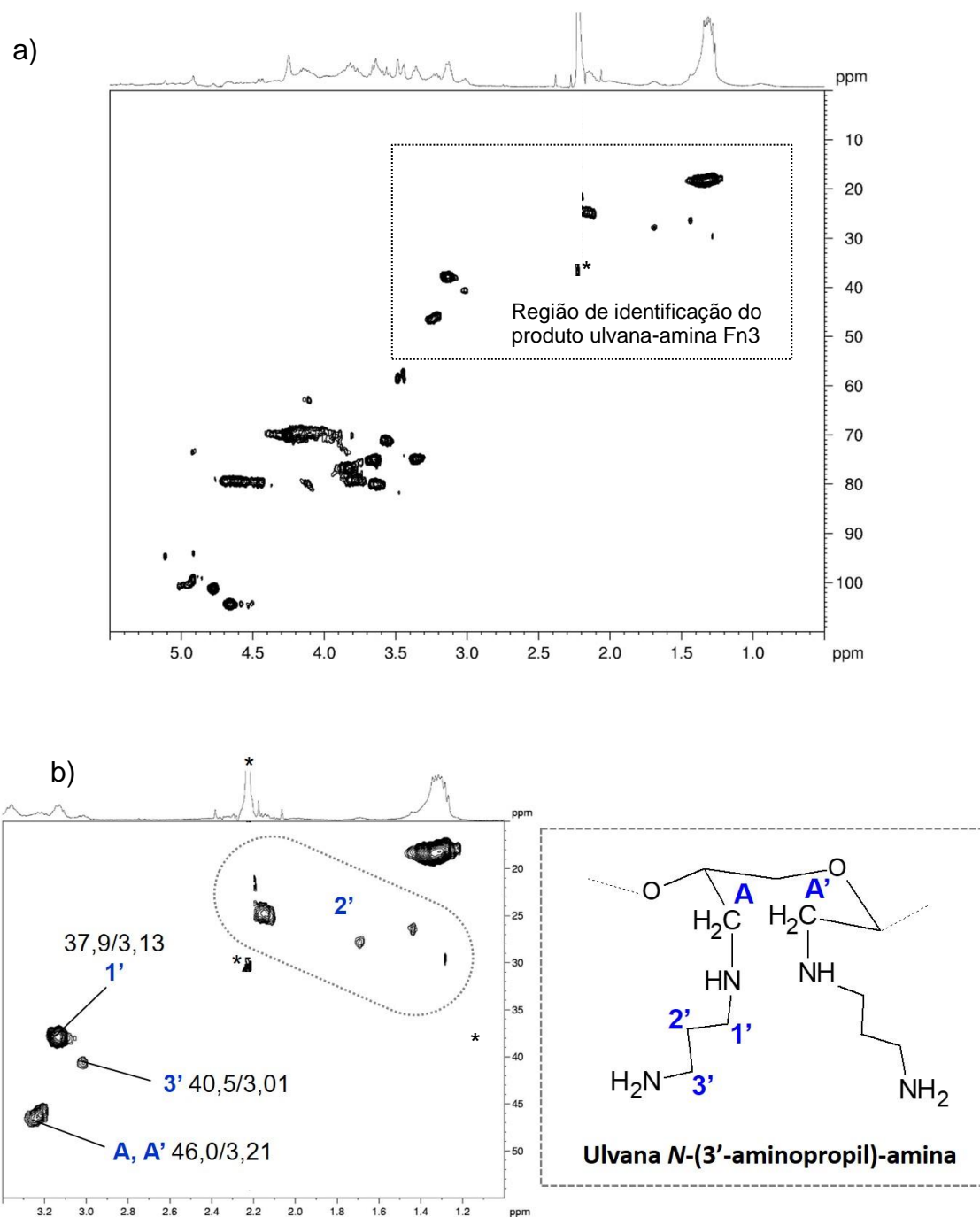
As unidades de α -L-ramnose 3-sulfato e β -D-xilose 2-sulfato são resistentes à oxidação em decorrência das substituições por grupos sulfato em C3 e C2, respectivamente. No entanto as unidades de ácido β -D-glucurônico foram resistentes à oxidação, mas não apresentam substituições por grupos sulfato. Desta forma, possivelmente, as unidades de ácido β -D-glucurônico assumiram a conformação de cadeira 1C_4 a qual manteria as hidroxilas de C2 e C3 em posição axial-axial, o que impede a oxidação desta unidade por íons periodato ou ainda pode ter ocorrido a formação de hemiacetais intracadeias entre as regiões que sofreram oxidação com as unidades de ácido β -D-glucurônico (Lindberg *et al.*, 1975; Fransson, 1974).

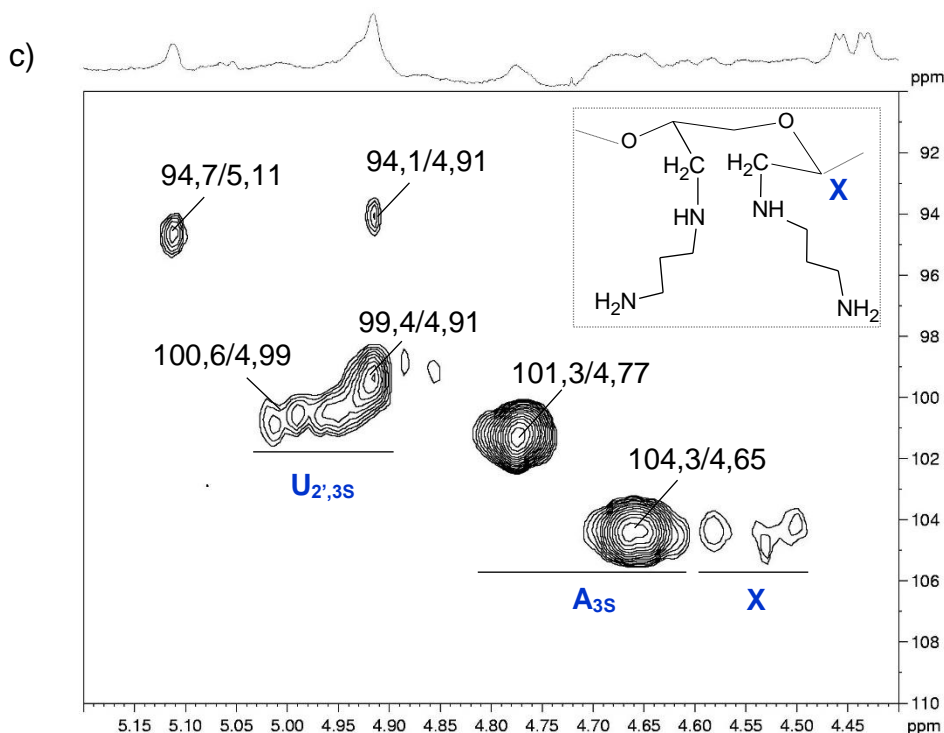
Na região anomérica do espectro de HSQC da fração Fn3, ainda pôde-se atribuir as correlações na região de 104,3-105,0/4,50-4,58 ppm aos carbonos e hidrogênios anoméricos das unidades de β -D-xilose oxidadas e aminadas, representadas pela letra X na FIGURA 54c.

Adicionalmente, foram identificados dois sinais na região anomérica da fração Fn3, em 94,7/5,11 e 94,1/4,91 ppm. Estas correlações foram atribuídas aos C1/H1 de unidades monossacarídicas redutoras presentes no polímero (FIGURA 54c) (Breitmaier e Voelter, 1990). A presença destas extremidades redutoras concorda com

a diminuição da massa molar ponderal média relativa (M_w) observada para a ulvana-amina Fn3 em relação à ulvana nativa F, demonstrando que o processo de oxidação-aminação redutiva provocou despolimerização das cadeias polissacarídicas.

FIGURA 54 - ESPECTRO DE HSQC DA ULVANA-AMINA Fn3





a) Espectro de HSQC da fração Fn3 obtida da reação de oxidação-aminação redutiva da fração F na presença de 1,3-diaminopropano; b) inserto da região do espectro de HSQC da ulvana amina Fn3 que identifica a ulvana *N*-(3'-aminopropil)-amina (Fn3); c) inserto da região anomérica do espectro de HSQC da ulvana amina Fn3 (C1/H1). Solvente: D₂O, 30 °C; padrão interno acetona (*) (31,45 e 2,225 ppm). Fonte: O autor (2017).

A fração Fn6 resultou da reação de oxidação-aminação redutiva da ulvana F em presença da diamina 1,6-diaminoexano (HMD). O espectro de HSQC da fração Fn6 (FIGURA 55) permitiu atribuir as correlações em 49,3/3,31 e 3,13 ppm aos carbonos e hidrogênios dos grupos -CH₂- originados pela aminação redutiva e ligados à diamina (A e A' na FIGURA 55b). Adicionalmente, aos C1'/H1' e C6'/H6' da cadeia alquila *N*-6'-aminohexil derivada da diamina foram atribuídas as correlações 38,0/3,13 e 40,7/3,02 ppm, respectivamente. Na região de 25,0-28,0/1,80-1,20 ppm foram identificadas diferentes correlações para os grupos -CH₂- da HMD (FIGURA 55b).

A região anomérica do espectro de HSQC da fração Fn6 também apresentou as díades resistentes à oxidação com periodato A_{3s} e U_{2',3s}. A correlação em 104,8/4,58 ppm foi atribuída aos C1/H1 das unidades de β-D-xilose oxidadas e aminadas (FIGURA 55c).

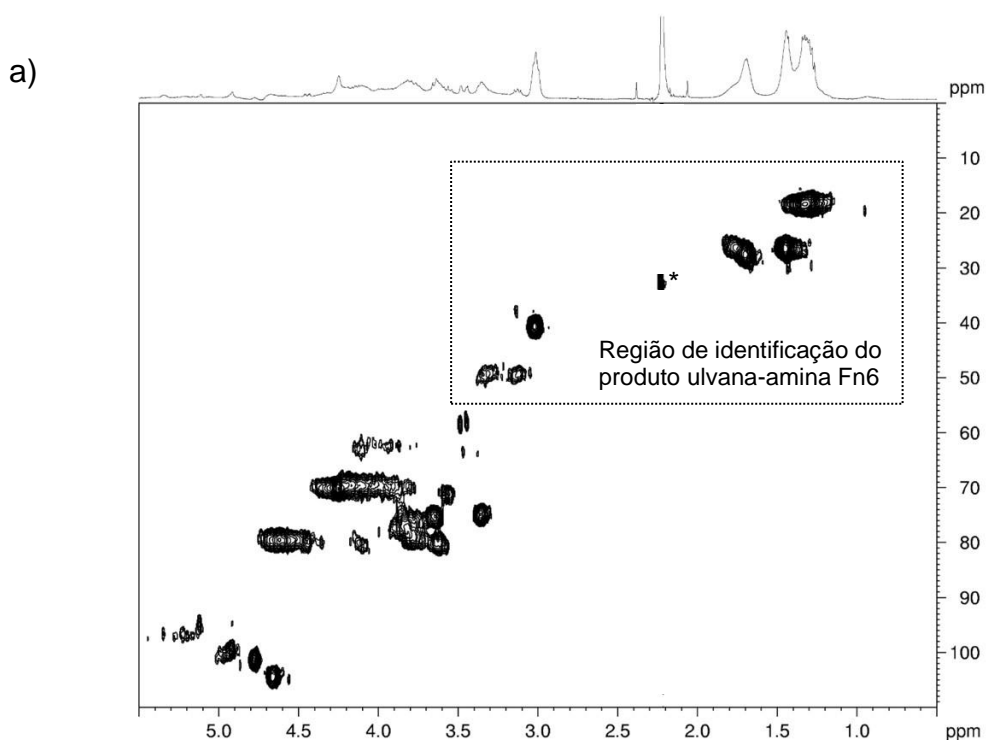
Assim como para Fn3, o espectro de HSQC da fração Fn6 também mostrou correlações referentes a extremidades redutoras na região de 97,0-94,0/4,91-5,35 ppm (FIGURA 55c) (Breitmaier e Voelter, 1990). No entanto, a fração Fn6 parece apresentar maior diversidade de terminações redutoras quando comparada a Fn3,

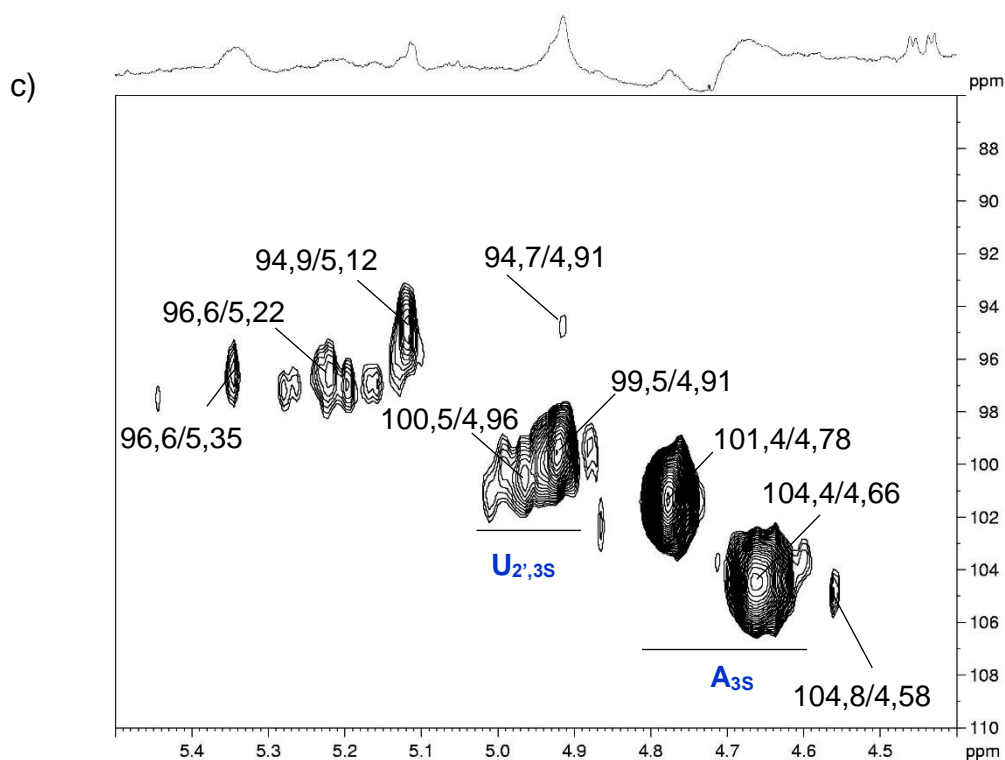
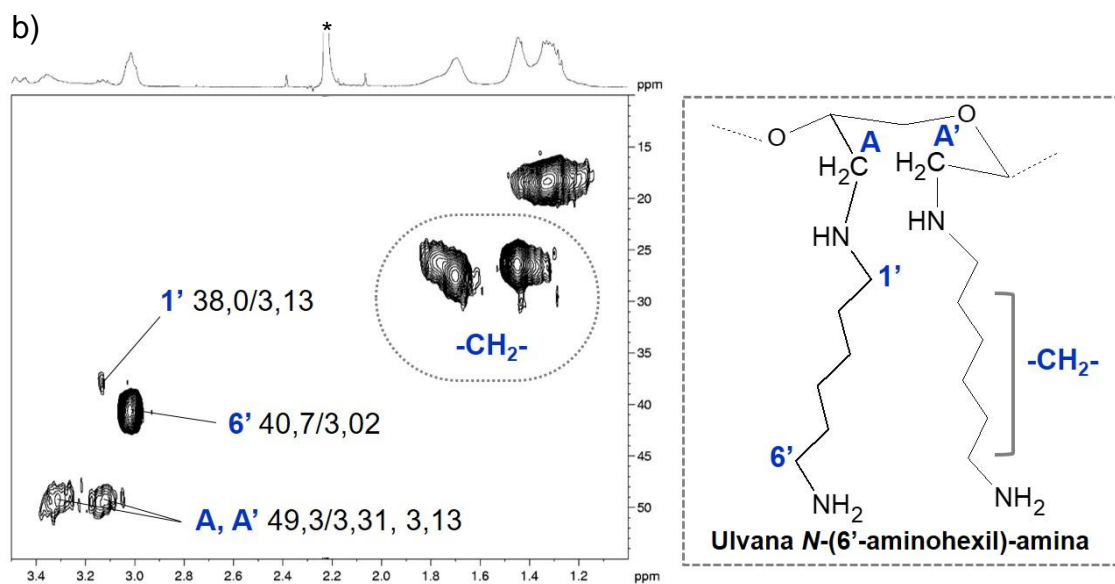
tendo em vista a presença de correlações adicionais, como em 96,6/5,35 e 96,6/5,22 ppm (FIGURA 55c). São necessários estudos adicionais destes derivados amina para a determinação dos deslocamentos químicos, contudo, a diversidade de correlações de C1/H1 redutores pode ter ocorrido em função de diferentes padrões de despolimerização das cadeias polissacarídicas destas ulvanas-amina.

A integração das áreas referentes às díades resistentes nos espectros de HSQC das frações Fn3 e Fn6 mostrou que existem três díades do tipo A_{3S} para uma díade do tipo U_{2,3S}. Esta proporção condiz com a encontrada para estas díades através da análise de metilação (TABELA 14, página 111). Estas díades resistentes somam aproximadamente 50% da ulvana nativa, então pôde-se concluir que 50% da ulvana foi oxidada.

O processo de oxidação-aminação redutiva sequencial representou uma abordagem nova na obtenção de derivados aminados. A utilização desta sequência reacional com duas diaminas diferentes, 1,3-diaminopropano e 1,6-diaminoexano, permitiu obter dois derivados ulvana-amina inéditos, Fn3 e Fn6. Estas ulvanas-amina puderam ser parcialmente caracterizadas por métodos químicos e espectroscópicos.

FIGURA 55 - ESPECTRO DE HSQC DA ULVANA-AMINA Fn6





a) Espectro de HSQC da fração Fn6 obtida da reação de oxidação-aminação redutiva da fração F na presença de 1,6-diaminoexano; b) inserto da região do espectro de HSQC da ulvana amina Fn6 que identifica a ulvana *N*-(6'-aminohexil)-amina (Fn6); c) inserto da região anomérica do espectro de HSQC da ulvana amina Fn6 (C1/H1). Solvente: D₂O, 30 °C; padrão interno acetona (*) (31,45 e 2,225 ppm). Fonte: O autor (2017).

7.11 SEMISSÍNTESE DE POLISSACARÍDEOS HÍBRIDOS A PARTIR DAS ULVANAS-AMINA Fn3 E Fn6

Posteriormente à inserção de grupos amina nas ulvanas via oxidação-aminação redutiva, a semissíntese dos polissacarídeos híbridos foi realizada por meio de uma segunda etapa de aminação redutiva em presença das ulvanas-amina, Fn3 ou Fn6, *kappa*-carrabiose (fração Kb) e agente redutor.

A semissíntese dos híbridos-amina foi conduzida de acordo com as condições reacionais de aminação redutiva utilizadas para a semissíntese dos híbridos-amida, Fd3-Kb e Fd6-Kb. As reações de semissíntese de Fn3-Kb e Fn6-Kb foram conduzidas, separadamente, em água com as ulvanas-amina Fn3 ou Fn6, 32,6 mmol.L⁻¹ de *kappa*-carrabiose (Kb), 12,5 mmol.L⁻¹ de AcOH e 43 mmol.L⁻¹ de NaBH₃CN em pH inicial igual a 5,0, sob agitação, a 55 °C por 15 h. As misturas reacionais foram dialisadas e os polissacarídeos híbridos foram recuperados após liofilização, resultando nas frações Fn3-Kb e Fn6-Kb.

7.12 CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES HÍBRIDAS Fn3-Kb E Fn6-Kb

7.12.1 Análises químicas das frações híbridas Fn3-Kb e Fn6-Kb

As frações Fn3-Kb e Fn6-Kb apresentaram recuperação acima de 100%, o que sugere a adição de massa da fração Kb após formação da ligação covalente C-N por aminação redutiva (TABELA 25).

TABELA 25 - RECUPERAÇÃO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES Fn3, Fn6, Fn3-Kb e Fn6-Kb

Frações	Recuperação ^a (%)	Carboidrato ^b (%)	Sulfato ^c (%)	Urônicos ^d (%)	Proteína ^e (%)	Nitrogênio ^f (%)	[α] ^{Dg} (°)
Fn3 ^h	23,4	56,9	25,4	17,2	3,6	3,00	- 65,3
Fn3-Kb	128,0	48,0	19,6	9,0	3,3	1,74	- 36,0
Fn6 ^h	55,0	54,9	28,5	13,1	1,8	2,78	- 71,1
Fn6-Kb	114,0	46,8	29,0	7,9	2,7	1,96	- 60,8

^a Recuperação em relação a massa de material submetido à modificação; ^{b, c, d, e} Determinações de acordo com os métodos de Dubois *et al.* (1956), Dodgson e Price (1962), Filisetti-Cozzi e Carpita (1991) e Lowry *et al.* (1951), respectivamente; ^f Análise elementar de N em g% (m/m); ^g Rotação óptica específica, determinada a 20 °C em solução aquosa 0,2% (m/v); ^h Fração incluída para fins comparativos.

As dosagens de carboidratos e proteínas totais foram condizentes com os valores encontrados para as frações originais Fn3 e Fn6. A porcentagem de sulfato foi similar entre as frações Fn6-Kb e original Fn6. No entanto, para a fração Fn3-Kb houve uma diminuição da porcentagem de sulfato em relação à Fn3. Isto pode estar correlacionado ao aumento de massa observado para Fn3-Kb, o qual foi maior que para Fn6-Kb. Assim, é possível que a substituição dos grupos amino livres tenha sido mais eficaz para a fração Fn3-Kb, de forma que esta apresentou maior recuperação em massa e menor porcentagem de grupos sulfato (TABELA 25). Apesar da *kappa*-carrabiose ser sulfatada, esta apresenta sulfato apenas em C4 da unidade A, portanto, não sendo suficiente para incrementar os valores de sulfato.

O conteúdo de ácidos urônicos também se mostrou diminuído para as frações de polissacarídeos híbridos Fn3-Kb e Fn6-Kb, o que pode ser relacionado ao incremento de massa pela adição de Kb ao polímero aminado (TABELA 25).

Também em função do aumento de massa, os polissacarídeos híbridos Fn3-Kb e Fn6-Kb mostraram teores de nitrogênio diminuídos em relação à Fn3 e Fn6 (TABELA 25).

A maior diminuição no valor absoluto de rotação óptica específica foi observada para a fração Fn3-Kb, o que sugere a presença de maior quantidade de unidades da série enantiomérica D-, para esta fração. Assim, os valores de rotação óptica condizem com a maior recuperação de massa para o polissacarídeo híbrido Fn3-Kb (TABELA 25).

7.12.2 Análise de HPSEC-MALLS-RI das frações híbridas Fn3-Kb e Fn6-Kb

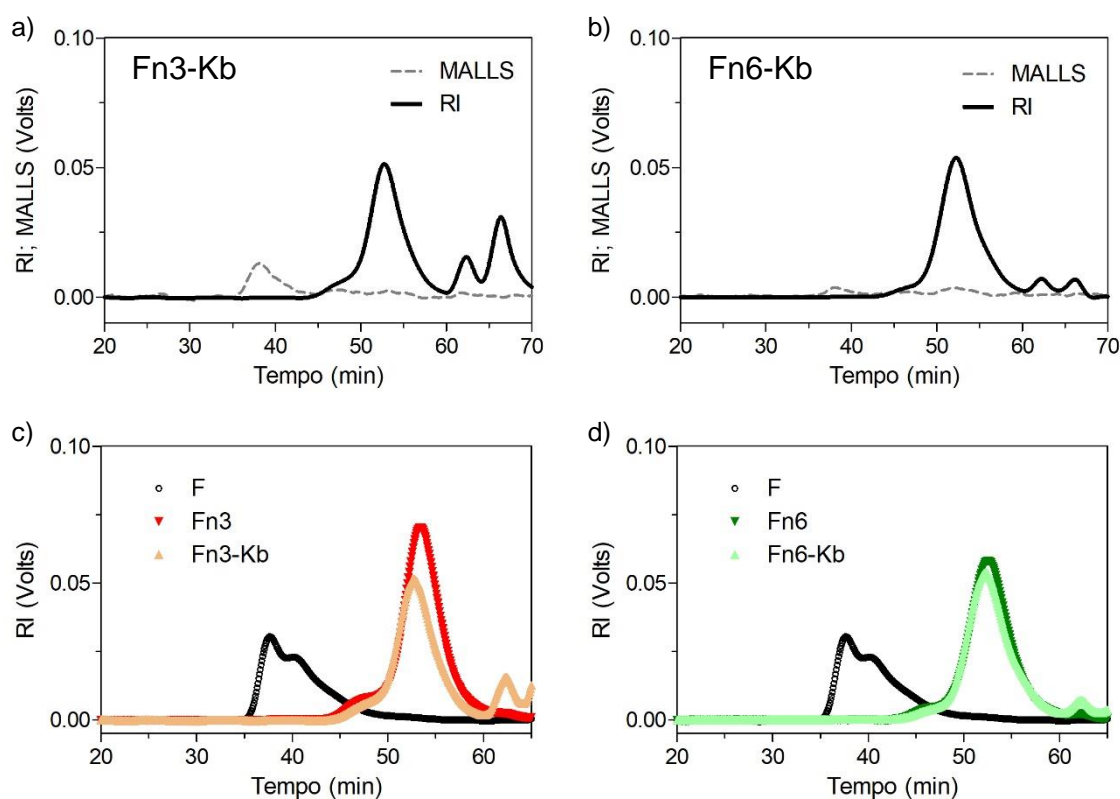
Os cromatogramas de HPSEC-MALLS-RI das ulvanas-amina híbridas Fn3-Kb e Fn6-Kb apresentaram perfis cromatográficos similares às frações Fn3 e Fn6, respectivamente. Não foram observadas alterações na detecção de RI na região de 40 minutos tanto para Fn3-Kb quanto para Fn6-Kb, no entanto ambas também mostraram, mesmo que em baixa intensidade, detecção de um pico por MALLS (90°) em aproximadamente 37 minutos. Estas populações podem ser representativas dos fragmentos da ulvana resistentes à oxidação (FIGURA 56a e b).

Os cromatogramas referentes ao detector RI para as frações Fn3-Kb e Fn6-Kb comparadas às frações originais Fn3 e Fn6, respectivamente, mostraram que as

distribuições de massa dos polissacarídeos híbridos foram semelhantes às frações originais (FIGURA 56c e d).

As massas molares médias ponderais (M_w) relativas das frações Fn3-Kb e Fn6-Kb foram iguais a 74.460 e 77.086 g.mol⁻¹, respectivamente. Assim, as ulvanas-amina híbridas Fn3-Kb e Fn6-Kb apresentaram aumento de massa de ~5 e 2%, respectivamente, sobre as massas molares médias ponderais (M_w) dos polissacarídeos originais Fn3 e Fn6 (FIGURA 56c e d).

FIGURA 56 - CROMATOGRAMAS DE HPSEC-MALLS-RI DAS ULVANAS-AMINA HÍBRIDAS Fn3-Kb E Fn6-Kb E HPSEC-RI DAS FRAÇÕES F, Fn3, Fn3-Kb, Fn6 E Fn6-Kb



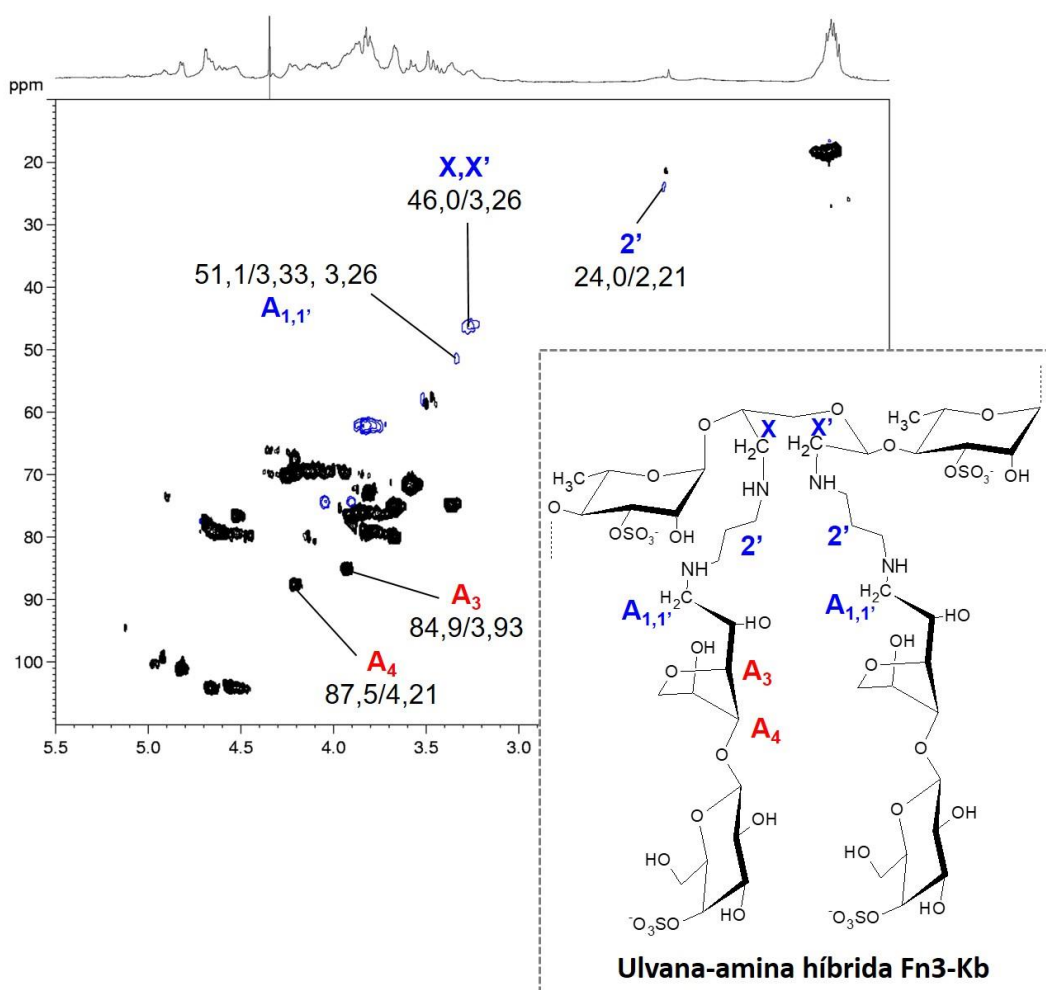
Cromatogramas de HPSEC-MALLS-RI com o detector MALLS (90°) e índice de refração (RI) plotados em relação ao tempo de retenção (min) das frações Fn3-Kb (a) e Fn6-Kb (b). Cromatogramas de HPSEC-RI comparativos entre as frações F, Fn3 e Fn3-Kb (c) e F, Fn6 e Fn6-Kb (d). FONTE: O autor (2017).

7.12.3 Espectroscopia de RMN das frações Fn3-Kb e Fn6-Kb

A fração Fn3-Kb foi obtida a partir da segunda etapa de reação de aminação redutiva, conduzida com a ulvana-amina Fn3 e a *kappa*-carrabiose (Kb). O espectro de HSQC-editado da fração Fn3-Kb (FIGURA 57) apresentou duas correlações características: (1) em 46,0/3,26 ppm, referente aos carbonos e hidrogênios dos

grupos $-\text{CH}_2-$ aminados com DAP (provenientes da primeira etapa de aminação redutiva) e (2) em 51,1/3,33, 3,26 ppm, correlação à qual foram atribuídos os C1/H1,1' das unidades de 3,6-anidro-D-galactose da *kappa*-carrabiose, reduzidas durante a segunda etapa de aminação redutiva. Estes assinalamentos de C1/H1,1' das unidades de 3,6-anidro-D-galactose estão de acordo com as análises de RMN das frações híbridas obtidas via amidação (página 149) bem como com a literatura (Silverstein *et al.*, 2007).

FIGURA 57 - ESPECTRO DE HSQC-EDITADO DA FRAÇÃO Fn3-Kb



Correlações negativas em azul. Solvente: D_2O , 70 °C; padrão interno acetona (31,45 e 2,225 ppm).
 FONTE: O autor (2017).

A região anomérica do espectro de HSQC-editado da fração Fn3-Kb mostrou as correlações referentes às díades A_{3S} e U_{2,3S}, resistentes à oxidação com periodato, e ainda a correlação em 104,0/4,55 ppm, referente aos C1/H1 das unidades de β-D-galactose 4-sulfato, do dissacarídeo de *kappa*-carragenana (FIGURA 57) (Lahaye *et al.* 1997; Lahaye, 1998; Gonçalves *et al.*, 2005).

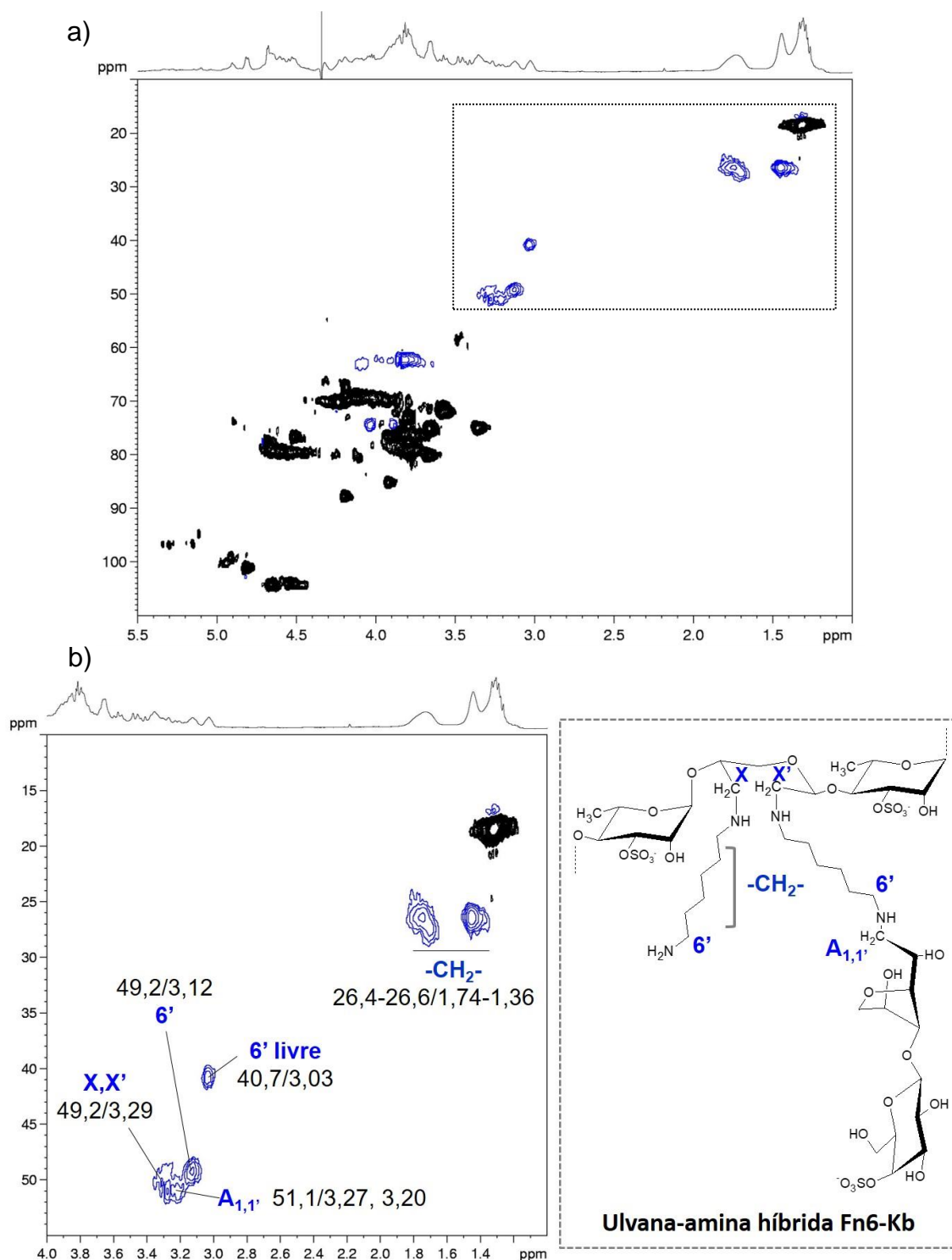
Na região de C2/H2 a C6/H6 do espectro de HSQC-editado da fração Fn3-Kb foi possível identificar a correlação em 67,4/4,20 ppm atribuída ao C2/H2 das unidades de 3,6-anidrogactose, bem como as correlações em 84,9/3,93, 87,5/4,21, 76,5/4,52 e 74,3/4,04, 3,90 ppm, respectivamente, referentes aos C3/H3, C4/H4, C5/H5 e C6/H6,6' das mesmas unidades. As unidades de β-D-galactose 4-sulfato também foram assinaladas pelas correlações 71,6/3,58, 72,8/3,81, 77,5/4,69, 75,8/3,87 e 62,0/3,81, 3,81 ppm, referentes, respectivamente aos C2/H2, C3/H3, C4/H4, C5/H5 e C6/H6,6' (FIGURA 57) (Gonçalves *et al.*, 2005).

Ainda no espectro de HSQC-editado da fração Fn3-Kb, a correlação em 24,0/2,21 ppm foi atribuída a C2'/H2' do grupo N-3'-aminopropil. As correlações referentes a C1'/H1' e C3'/H3' provenientes da DAP, não foram visualizadas. A ausência da correlação em 40,5/3,01 ppm indica que não há extremidades livres da diamina e todas puderam ser reduzidas às ligações C-N, ligando-se a *kappa*-carrabiose. A complexidade de ambientes químicos em que se encontram as moléculas da diamina no polímero oxidado/aminado pode colaborar para a supressão dos sinais referentes às extremidades das diaminas ligadas à ulvana (FIGURA 57).

A fração Fn6-Kb foi obtida a partir da reação da segunda etapa de aminação redutiva conduzida com a ulvana-amina Fn6 e a *kappa*-carrabiose (Kb). O espectro de HSQC-editado da fração Fn6-Kb (FIGURA 58) apresentou em 40,7/3,03 ppm a correlação referente a C6'/H6' do grupo N-6'-aminohexil proveniente da diamina 1,6-diaminoexano, enquanto as correlações na região de 26,4-26,6/1,74-1,36 ppm foram atribuídas aos metilenos C2'/H2' a C5/H5'.

As correlações em 51,1/3,27, 3,20 e 49,2/3,29, 3,12 ppm, corresponderam, respectivamente, aos C1/H1,1' das unidades de 3,6-anidrogactose da *kappa*-carrabiose e aos C2/H2 e C3/H3 dos grupos -CH₂- (X, X') obtidos por aminação redutiva dos aldeídos formados pela oxidação da ulvana. Estas correlações comprovam a semissíntese do polissacarídeo híbrido (FIGURA 58b).

FIGURA 58 - ESPECTRO DE HSQC-EDITADO DA FRAÇÃO Fn6-Kb



Assim como para a fração Fn3-Kb, o espectro de HSQC-editado da fração Fn6-Kb mostrou, na região anomérica, as correlações referentes às díades A_{3s} e U_{2',3s}, resistentes à oxidação com periodato, além da correlação em 104,1/4,53 ppm, referente aos C1/H1 das unidades de β-D-galactose 4-sulfato da *kappa*-carrabiose

reduzida (Lahaye *et al.* 1997; Lahaye, 1998; Gonçalves *et al.*, 2005). É possível que a segunda etapa de aminação redutiva, utilizada para a semissíntese do polissacarídeo híbrido Fn6-Kb, tenha promovido a redução das extremidades redutoras formadas na etapa de oxidação-aminação redutiva. Assim, observou-se a diminuição da intensidade ou o desaparecimento de algumas das correlações na região de 97,0-94,0/4,91-5,35 ppm, referente aos C1/H1 redutores (FIGURA 58).

Na região de C2/H2 a C6/H6 do espectro de HSQC-editado da fração Fn6-Kb foi possível identificar a correlação em 67,4/4,18 ppm atribuída ao C2/H2 das unidades de 3,6-anidrogactose, bem como as correlações em 85,1/3,92, 87,8/4,20, 76,7/4,51 e 74,5/4,03, 3,89 ppm, respectivamente, referentes aos C3/H3, C4/H4, C5/H5 e C6/H6,6' das mesmas unidades. As unidades de β -D-gactose 4-sulfato também foram assinaladas pelas correlações em 72,0/3,56, 73,1/3,80, 77,8/4,69, 75,9/3,87 e 62,3/3,81, 3,81 ppm, referentes, respectivamente aos C2/H2, C3/H3, C4/H4, C5/H5 e C6/H6,6' (FIGURA 58) (Gonçalves *et al.*, 2005).

As integrações das correlações em 40,7/3,03 e 51,1/3,27, 3,20 ppm presentes na fração Fn6-Kb permitiram estimar a proporção de ligação entre a *kappa*-carrabiose e a ulvana oxidada. Dentre os grupos N-6'-aminohexil inseridos na ulvana, 60% foram ligados à *kappa*-carrabiose. A fração Fn6 teve 26% de aminação na primeira etapa de aminação redutiva, portanto, pôde-se concluir que a ulvana funcionalizada por oxidação-aminação foi capaz de ligar aproximadamente 15% de *kappa*-carrabiose.

A fração Fn3-Kb apresentou 36% de aminação na primeira etapa de aminação redutiva e não apresentou indícios de extremidades de amina livre na segunda etapa, portanto, considerou-se que ocorreu 100% de ligação à *kappa*-carrabiose. Assim a fração Fn3 foi capaz de ligar aproximadamente 36% de *kappa*-carrabiose.

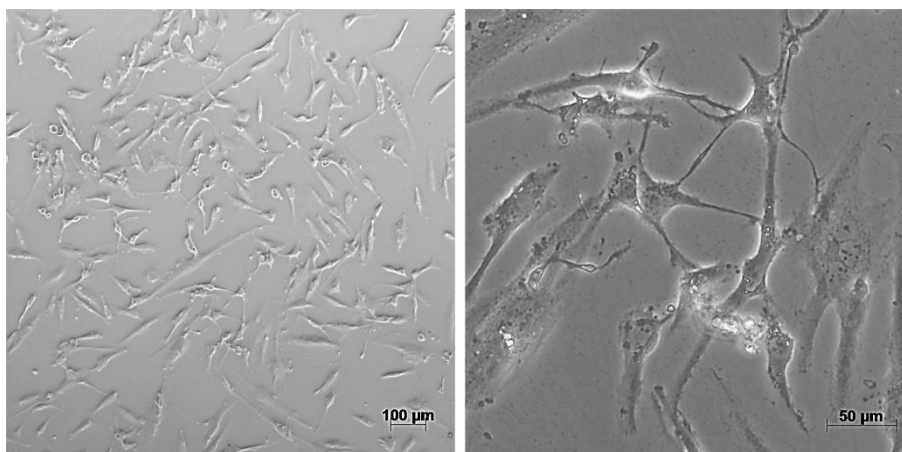
Essas estimativas do grau de ligação dos grupos amino inseridos na ulvana via oxidação-aminação estão de acordo com a recuperação de massa acima de 100% para as frações Fn3-Kb e Fn6-Kb.

As modificações químicas realizadas permitem concluir que a ulvana obtida de *U. fasciata* mostrou-se um polímero natural com excelente versatilidade para modificações químicas e que pode ser explorado em diferentes aplicações biotecnológicas. A seguir são abordados alguns ensaios biológicos realizados com as moléculas obtidas no presente trabalho.

7.13 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA *IN VITRO* DE FIBROBLASTO NORMAL HUMANO (MRC-5) E MELANOMA METASTÁTICO HUMANO (WM9) NA PRESENÇA DAS ULVANAS MODIFICADAS

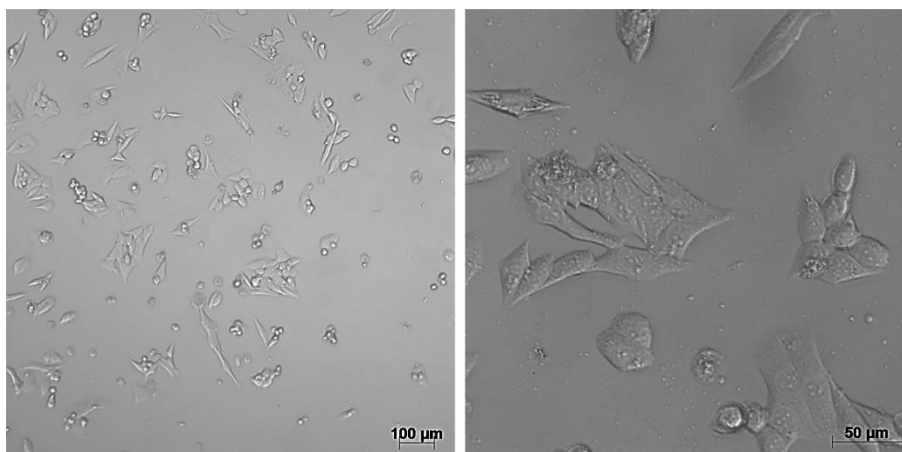
Com o objetivo de avaliar a citotoxicidade para células normais e tumorais as ulvanas modificadas via amidação e oxidação-aminação redutiva, bem como os polissacarídeos híbridos produzidos a partir dos derivados ulvana e *kappa*-carrabiose, F, Fd5m, Fd3, Fd6, Fd3-Kb, Fd6-Kb, Fn3, Fn6, Fn3-Kb e Fn6-Kb (FIGURA 9, página 56) foram avaliados por meio de ensaios de atividade metabólica pelo método colorimétrico do MTT utilizando linhagens de fibroblasto normal humano MRC-5 (FIGURA 59) e melanoma metastático humano WM9 (FIGURA 60).

FIGURA 59 - LINHAGEM DE FIBROBLASTO NORMAL HUMANO MRC-5



Fotos de microscopia óptica após 96 h de cultivo. FONTE: O autor (2016).

FIGURA 60 - LINHAGEM DE MELANOMA METASTÁTICO HUMANO WM9



Fotos de microscopia óptica após 96 h de cultivo. FONTE: O autor (2017).

7.13.1 Citotoxicidade frente à linhagem de fibroblasto normal humano MRC-5

A linhagem de fibroblasto humano (pulmonar) MRC-5 foi utilizada para a avaliação da citotoxicidade das ulvanas frente a células normais.

A ulvana nativa F, as ulvanas-amida Fd5m, Fd3 e Fd6 e os híbridos Fd3-Kb e Fd6-Kb não apresentaram citotoxicidade frente à linhagem de fibroblasto humano MRC-5 após 72 h de exposição, nas concentrações de 25 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, pois não houve significância estatística entre a porcentagem de células metabolicamente ativas tratadas com estes polissacarídeos em relação ao controle (FIGURA 61).

A concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ mostrou-se citotóxica apenas para o polissacarídeo híbrido Fd3-Kb, que foi capaz de reduzir a porcentagem de células metabolicamente ativas de fibroblasto normal humano em 44,2% em relação ao controle. Destaca-se ainda que a ulvana-amida Fd6 e o híbrido-amida Fd3-Kb mostraram tendências em diminuir a porcentagem de células normais metabolicamente ativas de forma concentração dependente (FIGURA 61).

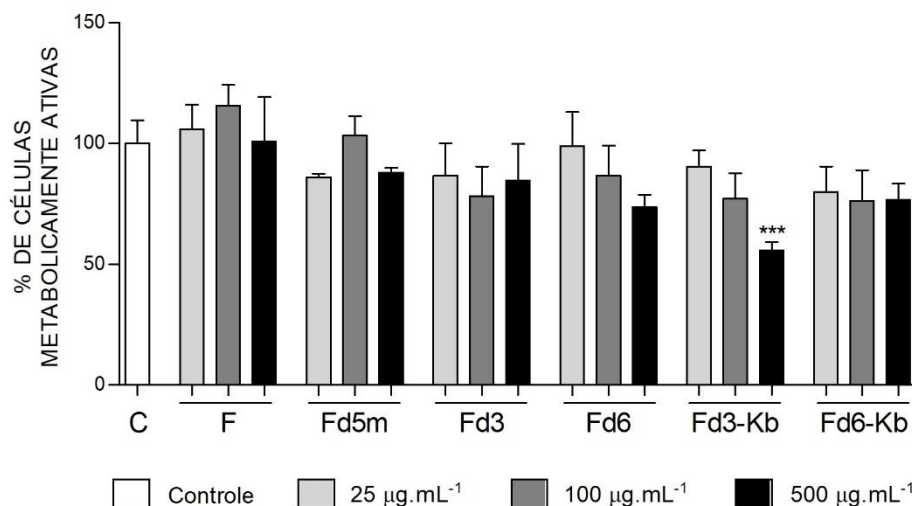
As ulvanas-amida Fd5m, Fd3 e Fd6 apresentaram, respectivamente, 37, 46 e 20% de amidação e redução de aproximadamente 37, 30 e 15% do conteúdo de ácidos urônicos em relação à ulvana nativa F (TABELA 18, página 130). Assim, é possível inferir que a redução do conteúdo de ácidos urônicos e a amidação com *n*-pentilamina, 1,3-diaminopropano e 1,6-diaminoexano não promoveu efeito citotóxico nas ulvanas modificadas via amidação testadas pelo método do MTT frente à linhagem MRC-5.

Os híbridos-amida Fd3-Kb (21,9% de sulfato, 12,4% de ácidos urônicos, 1,56% de nitrogênio) e Fd6-Kb (21,7% de sulfato, 15,3% de ácidos urônicos, 1,16% de nitrogênio) apresentaram diferentes taxas de ligação à *kappa*-carrabiose, sendo Fd3-Kb 100% híbrido, pois todas as extremidades amina foram ligadas à Kb, enquanto Fd6-Kb mostrou-se 58% híbrido, permanecendo com 42% de extremidades amina livres. Assim, pode-se sugerir que o derivado de *kappa*-carrabiose, em maior proporção no híbrido Fd3-Kb, está relacionado com o caráter citotóxico desta fração.

As ulvanas-amina Fn3 e Fn6 e os híbridos Fn3-Kb e Fn6-Kb apresentaram comportamento diferenciado em relação aos derivados ulvanas-amida. A ulvana-amina Fn6 e os híbridos Fn3-Kb e Fn6-Kb mostraram-se capazes de reduzir significativamente a porcentagem de células MRC-5 metabolicamente ativas, quando

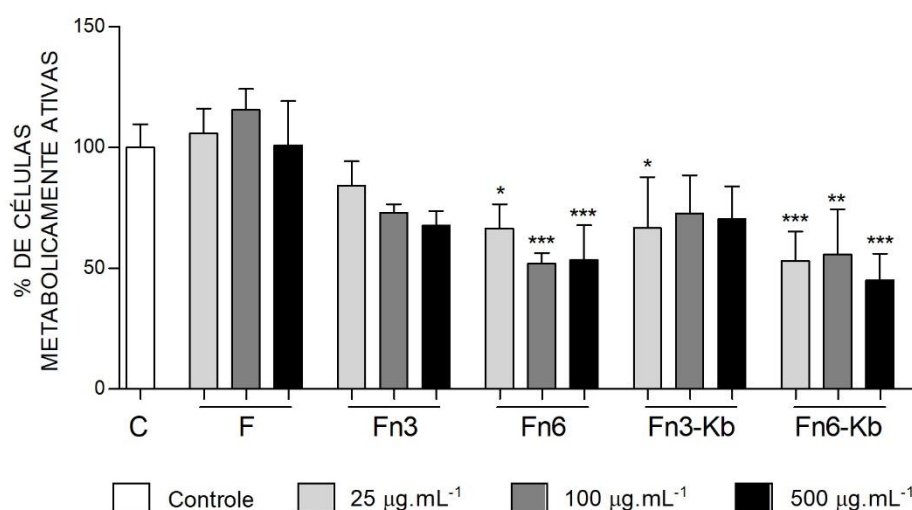
comparados ao controle, após 72 h de exposição, nas concentrações de 25, 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (FIGURA 62).

FIGURA 61 - ATIVIDADE METABÓLICA DA LINHAGEM DE FIBROBLASTO NORMAL HUMANO MRC-5 APÓS 72 h DE TRATAMENTO COM ULVANA F, ULVANAS-AMIDA Fd5m, Fd3 E Fd6 E HÍBRIDOS-AMIDA Fd3-Kb E Fd6-Kb NAS CONCENTRAÇÕES DE 25, 100 E 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$



Atividade metabólica da linhagem de fibroblasto normal humano MRC-5 após 72 h de tratamento com 25, 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ulvana F, ulvanas-amida Fd5m, Fd3 e Fd6 e híbridos-amida Fd3-Kb e Fd6-Kb. A condição controle é representada como 100% de atividade metabólica. Os dados mostrados são relativos a 3 experimentos independentes realizados em triplicatas. Significância estatística entre o controle e a fração Fd3-Kb de acordo com a ANOVA seguida do teste Tukey (***) = $p < 0,001$).

FIGURA 62 - ATIVIDADE METABÓLICA DA LINHAGEM DE FIBROBLASTO NORMAL HUMANO MRC-5 APÓS 72 h DE TRATAMENTO COM ULVANA F, ULVANAS-AMINA Fn3 E Fn6 E HÍBRIDOS-AMINA Fn3-Kb E Fn6-Kb NAS CONCENTRAÇÕES DE 25, 100 E 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$



Atividade metabólica da linhagem de fibroblasto normal humano MRC-5 após 72 h de tratamento com 25, 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ulvana F, ulvanas-amina Fn3 e Fn6 e híbridos-amina Fn3-Kb e Fn6-Kb. A condição controle é representada como 100% de atividade metabólica. Os dados mostrados são relativos a 3 experimentos independentes realizados em triplicatas. Significância estatística entre o controle e as frações de acordo com a ANOVA seguida do teste Tukey (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Em comparação com os derivados ulvana-amida, o metabolismo das células MRC-5 foi alterado mais drasticamente pelos derivados ulvana-amina, os quais provocaram, em média, cerca de 30% de redução na porcentagem de células metabolicamente ativas. A ulvana-amina Fn6 e o híbrido-amina Fn6-Kb, reduziram, respectivamente, em 47 e 55% o metabolismo das células MRC-5, na concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (FIGURA 62).

As taxas de aminação de Fn3 e Fn6 foram estimadas em 36 e 26%, respectivamente, sendo que a ulvana-amina Fn6 (28,5% de sulfato, 13,1% de ácidos urônicos, 2,78% de nitrogênio) apresentou maior tendência citotóxica quando comparada a ulvana-amina Fn3 (25,4% de sulfato, 17,2% de ácidos urônicos, 3,0% de nitrogênio) (FIGURA 62).

A ulvana-amina híbrida Fn6-Kb (29% de sulfato, 7,9% de ácidos urônicos e 1,96% de N) apresentou maior tendência em reduzir a porcentagem de células MRC-5 metabolicamente ativas quando comparada a híbrida Fn3-Kb (19,6% de sulfato, 9,0% de ácidos urônicos e 1,74% de N). Nota-se que as frações Fn6 e Fn6-Kb apresentaram elevados teores de sulfato (28,5 e 29,0% de sulfato, respectivamente), o que pode ter contribuído para a maior tendência em reduzir a atividade metabólica das células MRC-5 (FIGURA 62).

Destaca-se ainda que o processo de oxidação-aminação redutiva promoveu modificações mais extensas nas ulvanas quando em comparação com a amidação, de modo que a oxidação promove a clivagem das ligações entre C2 e C3 e gera estruturas com maiores graus de flexibilidade, em função da abertura da estrutura cíclica dos monossacarídeos suscetíveis à oxidação (Kristiansen *et al.*, 2010).

Adrien e colaboradores (2017) utilizaram o método do MTT para avaliar a citotoxicidade de ulvanas de diferentes massas molares, obtidas de *Ulva sp.*, em fibroblasto dérmico humano (NHDF) com 72 h de exposição das células aos polissacarídeos. Os resultados mostraram que a ulvana de massa molar de 57.000 g.mol^{-1} , composta predominantemente pela díade de ulvanobiurônico tipo A reduziu a proliferação dos fibroblastos em 36 e 50% nas concentrações de 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, enquanto a fração despolimerizada de menor massa (4.000 g.mol^{-1}) não alterou a atividade metabólica dos fibroblastos.

Os dados apresentados no presente trabalho demonstraram que a ulvana nativa F, extraída de *U. fasciata*, composta por aproximadamente 39% de díades de ulvanobiurônico tipo A e massa molar ponderal média (M_w) estimada em

211.755 g.mol⁻¹, não promoveu redução da atividade metabólica das células MRC-5, assim como os derivados ulvanas-amida Fd5m, Fd3 e Fd6, nas concentrações de 100 e 500 µg.mL⁻¹.

Contudo, a diminuição da proliferação celular observada por Adrien e colaboradores (2017) foi relacionada ao efeito citostático ao invés do efeito citotóxico, tendo em vista que não foram observadas alterações morfológicas das células em cultura. Adicionalmente, os autores verificaram o aumento da produção de componentes da matriz extracelular das células cultivadas. Estas observações permitiram concluir que os fibroblastos cultivados em presença das ulvanas foram preferencialmente orientados para a biossíntese de componentes de matriz extracelular em detrimento do crescimento celular (Adrien *et al.* 2017).

Andrès e colaboradores (2006) demonstraram que oligo- e polissacarídeos ricos em α-L-ramnose, isolados de cepas de bactérias do gênero *Klebsiella*, foram capazes de estimular a proliferação de fibroblastos dérmicos humanos (NHDF), além de estimular a biossíntese de colágeno e proteger componentes da matriz extracelular contra degradação mediada por radicais livres. Essas reações pareceram ser desencadeadas por lectinas específicas para reconhecimento de α-L-ramnose, as quais transmitem sinais específicos para o interior celular.

Destaca-se ainda que a ulvana de *Ulva lactuca* testada em linhagem de fibroblasto murino (L929), após 24 h de cultivo foi citocompatível, tendo os autores sugerido o uso deste polissacarídeo em aplicações biomédicas (Alves *et al.*, 2013b).

Os dados obtidos da avaliação das células de fibroblasto normal humano MRC-5 sugerem que a ulvana de *U. fasciata*, assim como as ulvanas-amida e híbridos-amida, são citocompatíveis. Entretanto, as ulvanas-amina e híbridos-amina, modificadas via oxidação-aminação redutiva, parecem reduzir o metabolismo de células normais.

Neste contexto, as ulvanas Fd3 e Fd6, funcionalizadas com grupos amino livres, constituem moléculas inéditas e com potenciais aplicações biotecnológicas, como componentes de curativos inteligentes e outros biomateriais.

7.13.2 Citotoxicidade frente à linhagem de melanoma metastático humano WM9

A linhagem de melanoma metastático humano WM9 foi utilizada para a avaliação da atividade citotóxica das ulvanas frente a células tumorais.

Os resultados dos ensaios de MTT mostraram a porcentagem de células WM9 metabolicamente ativas tratadas com 25, 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de polissacarídeo após 72 h de exposição. Todas as frações de ulvana, nativa e modificadas, promoveram diminuição significativa da atividade das células metastáticas de melanoma humano WM9 quando comparadas ao controle (FIGURA 63 e FIGURA 64).

A ulvana nativa F obtida de *U. fasciata* foi capaz de diminuir a atividade metabólica das células WM9 em 27,5; 25,0 e 26,5% para as concentrações de 25, 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, quando comparadas ao controle (FIGURA 63).

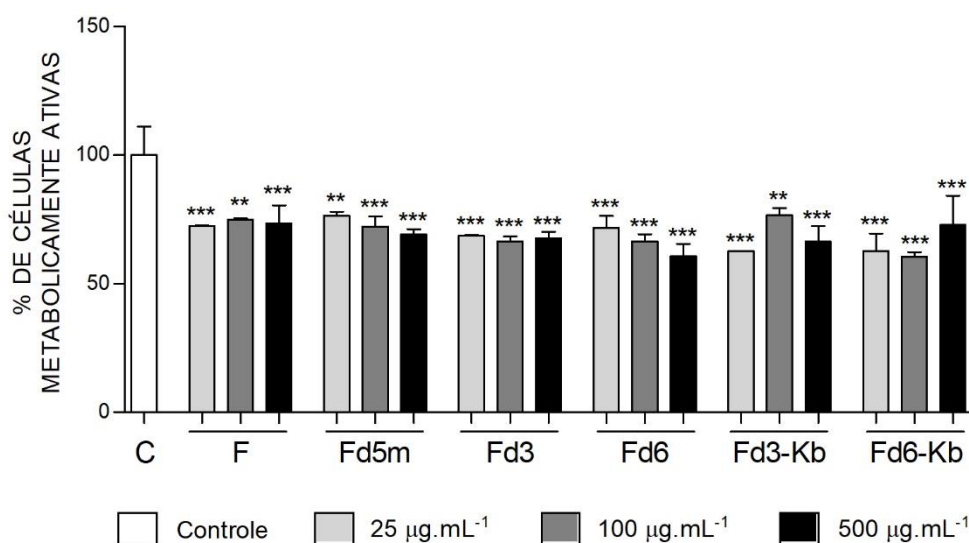
Shao e colaboradores (2013) avaliaram o efeito citotóxico da ulvana extraída de *U. fasciata* com tempo de exposição de 48 h frente a células tumorais gástrica (MKN45) e intestinal (DLD). Esta ulvana exibiu discreta atividade citotóxica de forma concentração dependente para ambas as linhagens tumorais, atingindo, na concentração de 1 mg.mL^{-1} , aproximadamente 15% de inibição das células gástricas MKN45 e 13% das células intestinais DLD.

Destaca-se que a ulvana F estudada no presente trabalho foi capaz de reduzir em 27,5% a atividade metabólica das células WM9, com tempo de exposição de 72 h, na concentração de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, uma concentração 40 vezes menor que a mencionada para as células tumorais gástrica (MKN45) e intestinal (DLD) utilizada para a ulvana estudada por Shao e colaboradores (2013).

As ulvanas-amida Fd5m e Fd6 apresentaram tendência em diminuir a porcentagem das células WM9 metabolicamente ativas conforme se aumenta a concentração de polissacarídeo. A ulvana-amida Fd5m diminuiu a atividade metabólica de WM9 em 23,5; 27,7 e 30,8% para as concentrações de 25, 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, enquanto, nestas mesmas concentrações, a ulvana-amida Fd6 promoveu a diminuição da atividade metabólica de WM9 em 28,2; 33,5 e 39,4%, respectivamente (FIGURA 63).

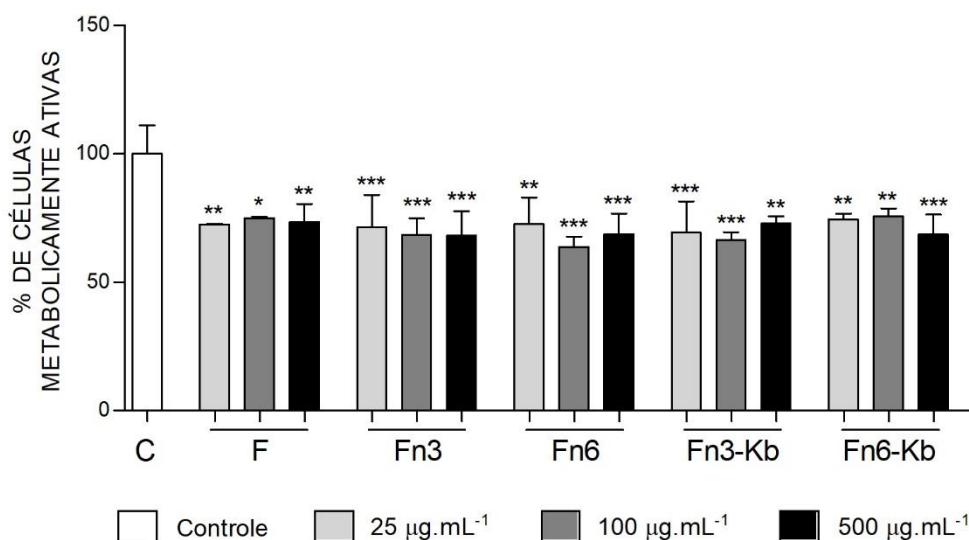
A ulvana-amida Fd3, nas concentrações de 25, 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, provocou significativa diminuição de 31,3; 33,5 e 32,2% das células WM9 metabolicamente ativas (FIGURA 63).

FIGURA 63 - ATIVIDADE METABÓLICA DA LINHAGEM DE MELANOMA METASTÁTICO HUMANO WM9 APÓS 72 h DE TRATAMENTO COM ULVANA F, ULVANAS-AMIDA Fd5m, Fd3 E Fd6 E HÍBRIDOS-AMIDA Fd3-Kb E Fd6-Kb NAS CONCENTRAÇÕES DE 25, 100 E 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$



Atividade metabólica da linhagem de melanoma metastático humano WM9 após 72 h de tratamento com 25, 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ulvana F, ulvanas-amida Fd5m, Fd3 e Fd6 e híbridos-amida Fd3-Kb e Fd6-Kb. A condição controle é representada como 100% de atividade metabólica. Os dados mostrados são relativos a 3 experimentos independentes realizados em triplicatas. Significância estatística entre o controle e as frações de acordo com a ANOVA seguida do teste Tukey (** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

FIGURA 64 - ATIVIDADE METABÓLICA DA LINHAGEM DE MELANOMA METASTÁTICO HUMANO WM9 APÓS 72 h DE TRATAMENTO COM ULVANA F, ULVANAS-AMINA Fn3 E Fn6 E HÍBRIDOS-AMINA Fn3-Kb E Fn6-Kb NAS CONCENTRAÇÕES DE 25, 100 E 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$



Atividade metabólica da linhagem de melanoma metastático humano WM9 após 72 h de tratamento com 25, 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ulvana F, ulvanas-amina Fn3 e Fn6 e híbridos-amina Fn3-Kb e Fn6-Kb. A condição controle é representada como 100% de atividade metabólica. Os dados mostrados são relativos a 3 experimentos independentes realizados em triplicatas. Significância estatística entre o controle e as frações de acordo com a ANOVA seguida do teste Tukey (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Tanto a ulvana-amida Fd6 quanto a ulvana-amida híbrida Fd6-Kb foram capazes de diminuir em 39% a atividade metabólica de WM9 em relação ao controle, respectivamente, nas concentrações de 500 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Destaca-se que a fração híbrida Fd6-Kb foi capaz de promover a mesma diminuição da atividade metabólica de WM9 que a fração Fd6, no entanto, em concentração cinco vezes menor (FIGURA 63). A ulvana-amida Fd6 (23,6% de sulfato, 18,7% de ácidos urônicos e 1,77% de nitrogênio) mostrou 20% de amidação das unidades de ácido β -D-glucurônico e a ulvana-amida híbrida Fd6-Kb (21,7% de sulfato, 15,3% de ácidos urônicos e 1,16% de nitrogênio) apresentou-se 58% híbrida, em função das unidades ácido β -D-glucurônico ligados à *kappa*-carrabiose.

As ulvanas modificadas via oxidação-aminação redutiva também foram avaliadas em relação a capacidade de alterar o metabolismo de células WM9. As ulvanas-amina Fn3 e Fn6 nas concentrações de 25, 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ promoveram diminuição significativa da atividade metabólica de WM9, respectivamente, em 28,6; 31,6 e 31,8% e 27,3; 36,1 e 31,2% em relação ao controle. As ulvanas-amina híbridas Fn3-Kb e Fn6-Kb nas concentrações de 25, 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ também promoveram diminuição significativa da atividade metabólica de WM9, respectivamente, em 30,5; 33,4 e 27,0% e 25,5; 24,4 e 31,3% em relação ao controle (FIGURA 64).

As ulvanas modificadas via oxidação-aminação redutiva foram capazes de diminuir em cerca de 30% a atividade metabólica tanto de fibroblasto normal humano MRC-5 quanto de melanoma metastático humano WM9. Assim, os derivados ulvana-amina não parecem atuar de forma seletiva frente a células normais ou tumorais.

Kaeffer e colaboradores (1999) mostraram que a ulvana nativa (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) extraída da alga verde *U. lactuca* não teve efeito citotóxico em células intestinais normais obtidas de cultura primária de células colônicas de ratos Wistar, bem como em linhagem tumoral de células intestinais (HT-29). No entanto a ulvana quimicamente modificada (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) por meio da redução dos grupos carboxílicos dos ácidos urônicos mostrou efeito inibitório na adesão das células HT-29, sugerindo efeito citotóxico. Os autores destacaram que a redução dos ácidos urônicos aparentemente aumentaram a acessibilidade dos grupos sulfato aos receptores da superfície celular, o que promoveu a citotoxicidade.

Neste contexto, destacam-se algumas das características estruturais dos derivados, produzidos e estudados no presente trabalho (ulvanas-amida, ulvanas-amina e derivados híbridos), em relação às suas propriedades citotóxicas. As ulvanas-

amida e híbridos-amida apresentaram em torno de 22 a 25% de grupos sulfato e diminuição de 15 a 37% dos grupos carboxílicos em relação à ulvana nativa F, devido aos processos de amidação. Enquanto que as ulvanas-amina e híbridos-amina apresentaram massas molares ponderais médias relativas (M_w) cerca de 60% menores que a ulvana nativa F e apresentaram entre 25 a 30% de grupos sulfato, além da maior flexibilidade das cadeias polissacarídicas, em função da oxidação com periodato. Assim, destaca-se que as ulvanas-amina e híbridos-amina, mesmo com menores M_w , se mostraram citotóxicas tanto para células MRC-5 quanto para células WM9, o que pode estar correlacionado aos seus maiores teores de sulfato em relação às ulvanas-amida, bem como a flexibilidade das cadeias polissacarídicas, que podem ter aumentado a acessibilidade dos grupos sulfato aos receptores celulares. Estes detalhes estruturais podem ter promovido a maior capacidade citotóxica observada para ulvanas-amina e híbridos-amina em relação às ulvanas-amida e híbridos-amida.

É importante destacar que as ulvanas nativa e modificadas via amidação mostraram baixa capacidade de alterar o metabolismo de fibroblasto normal humano MRC-5, ao passo que reduziram em média 30% da atividade metabólica das células de melanoma metastático humano WM9. Desta forma, sugere-se que os derivados ulvana-amida apresentaram citotoxicidade seletiva para as células de linhagem tumoral WM9, o que traz perspectivas interessantes para o uso destas moléculas em terapias antitumorais.

As modificações químicas realizadas no presente trabalho permitem aperfeiçoar o potencial antitumoral das ulvanas por meio da produção de polissacarídeos conjugados a fármacos anticâncer (Goodarzi *et al.*, 2013). As reações de amidação dos grupos carboxílicos dos ácidos urônicos presentes nas ulvanas pode ser realizada com diferentes medicamentos quimioterápicos que apresentam aminas primárias em suas estruturas, como doxorubicina, exatecana, citarabina, entre outros. Ainda há a possibilidade de utilizar duas etapas de amidação e ligantes do tipo diamina para promover a conjugação de quimioterápicos que apresentam grupos carboxílicos em sua estrutura como o metotrexato e a tretinoína.

A atividade citotóxica das ulvanas-amida e ulvanas-amina, bem como das ulvanas híbridas, abordada no presente trabalho, compõem resultados inéditos em termos de modificações químicas bem como na avaliação da atividade de ulvanas modificadas frente a células MRC-5 e WM9. Além disso, traz como perspectiva o estudo dos mecanismos de ação destas moléculas.

7.14 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE

7.14.1 Teste de tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT)

O tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) é utilizado para o monitoramento da formação do coágulo de fibrina e mede o efeito anticoagulante de forma geral incluindo todas as proteínas plasmáticas. Assim, as deficiências ou inibidores dos fatores de coagulação das vias intrínseca e final comum resultam no prolongamento do tempo de coagulação pelo teste de aPTT. Este método avalia a ativação dos fatores VIII e IX, além dos fatores de contato. A cefalina utilizada no teste atua como substituto plaquetário e a sílica constitui o fator de contato necessário para desencadear a coagulação. A ativação do fator XI é dependente de cálcio, por isso é necessária a adição de Ca^{2+} para ativação da cascata (Pomin, 2009).

As frações originais F e K, as modificadas Fd5m, Fd3, Fd6, Kb, K15, KS e KS15, assim como as frações de polissacarídeos híbridos sulfatados Fd3-Kb, Fd6-Kb, Fn3-Kb e Fn6-Kb foram avaliadas em relação ao seu potencial anticoagulante no ensaio de aPTT. As frações foram testadas nas concentrações de 10, 20, 50, 80, 100 e 150 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Os tempos de coagulação obtidos para as frações são mostrados na TABELA 26, sendo a salina o controle negativo, com tempo de coagulação igual a $29,6 \pm 1,1$ segundos e heparina, na concentração de 10 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, o controle positivo, com tempo de coagulação > 300 segundos. Os tempos de coagulação foram resultantes de triplicatas de um experimento independente.

Para facilitar a comparação entre a atividade anticoagulante das frações, foram calculadas, para cada fração, as concentrações necessárias para triplicar o tempo de coagulação da salina ($29 \times 3 = 88$ s) utilizando as equações obtidas por regressão linear dos tempos de coagulação plotados (s) em função das concentrações ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) testadas (TABELA 27). Desta forma as frações puderam ser comparadas em relação às concentrações necessárias para promover a coagulação num mesmo intervalo de tempo durante o teste de aPTT.

Assim, estimou-se que a ulvana F necessita de aproximadamente 1000 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ para alcançar a coagulação em três vezes o tempo da salina, enquanto a fração Fd5m o faz com 1300 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. As demais frações de ulvanas modificadas triplicam o tempo de coagulação da salina em concentrações entre 2400 a 3000 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, com exceção das frações Fd6-Kb, Fn3 e Fn3-Kb, as quais promovem

a coagulação em 88 s quando em concentrações de pelo menos 5200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, demonstrando menor capacidade anticoagulante (TABELA 27).

TABELA 26 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE UTILIZANDO O ENSAIO TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA (aPTT)

Fração	Concentração dos compostos ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)					
	10	20	50	80	100	150
F	28,8 \pm 0,6	30,6 \pm 1,8	34,9 \pm 0,3	33,6 \pm 0,9	35,2 \pm 0,0	36,4 \pm 1,9
Fd5m	29,3 \pm 1,0	32,8 \pm 0,5	35,5 \pm 2,1	36,5 \pm 0,9	34,4 \pm 3,0	37,1 \pm 1,5
Fd3	29,5 \pm 0,2	30,9 \pm 1,2	30,1 \pm 0,4	33,5 \pm 2,1	30,6 \pm 0,1	32,5 \pm 1,8
Fd6	30,5 \pm 0,7	31,6 \pm 0,8	30,7 \pm 0,5	35,9 \pm 0,6	30,9 \pm 0,2	33,6 \pm 0,6
Fd3-Kb	29,1 \pm 1,0	29,2 \pm 0,6	32,3 \pm 2,0	32,2 \pm 0,6	30,2 \pm 0,6	31,4 \pm 0,3
Fd6-Kb	28,8 \pm 0,5	30,1 \pm 1,8	30,4 \pm 0,7	32,4 \pm 1,0	30,2 \pm 0,7	31,0 \pm 0,5
Fn3	29,2 \pm 0,1	29,3 \pm 0,7	29,9 \pm 0,2	30,4 \pm 0,3	29,5 \pm 0,3	30,7 \pm 0,2
Fn6	29,5 \pm 0,5	28,9 \pm 0,3	30,2 \pm 0,5	30,4 \pm 0,5	31,2 \pm 0,2	32,7 \pm 1,3
Fn3-Kb	29,7 \pm 0,8	29,1 \pm 0,3	29,5 \pm 0,4	30,2 \pm 0,3	30,2 \pm 1,7	30,6 \pm 0,4
Fn6-Kb	29,1 \pm 0,2	29,1 \pm 0,1	29,6 \pm 0,4	30,1 \pm 1,2	29,3 \pm 0,5	31,7 \pm 0,5
K	30,2 \pm 0,3	29,9 \pm 0,8	34,1 \pm 0,9	36,7 \pm 1,7	42,0 \pm 1,7	46,8 \pm 2,4
Kb	40,1 \pm 0,8	31,3 \pm 1,9	29,5 \pm 0,3	33,1 \pm 0,4	31,2 \pm 0,4	30,7 \pm 0,3
K15	29,7 \pm 1,0	31,1 \pm 0,7	40,9 \pm 0,6	44,1 \pm 0,2	42,4 \pm 0,4	46,7 \pm 1,6
KS	71,2 \pm 1,3	145,9 \pm 2,1	>300	>300	>300	>300
KS15	56,0 \pm 3,9	90,2 \pm 3,5	231,4 \pm 4,5	>300	>300	>300

Controle negativo: salina, 29,6 \pm 1,1 s; Controle positivo: heparina, 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, >300 s.

TABELA 27 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FRAÇÃO NECESSÁRIA PARA TRIPLICAR O TEMPO DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA DA SALINA

Fração	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Fração	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Fração	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
F	1107,3	Fd6-Kb	5477,3	K	476,5
Fd5m	1298,1	Fn3	5157,1	Kb	56922,0
Fd3	3714,4	Fn6	2406,1	K15	475,2
Fd6	3599,9	Fn3-Kb	5218,6	KS	11,6
Fd3-Kb	3742,5	Fn6-Kb	3102,9	KS15	17,5

Faggio e colaboradores (2016) mostraram a ação anticoagulante de polissacarídeos de *Ulva fasciata* e *Agardhiella subulata* (Rhodophyta) por testes de aPTT. As frações polissacarídicas foram testadas nas concentrações de 10 e 20 mg.mL^{-1} . Os tempos de coagulação foram de 92 e 88 s para os extratos a 10 e

20 mg.mL⁻¹ de *U. fasciata*, respectivamente, e > 100 s em ambas as concentrações testadas para os polissacarídeos de *Agardhiella subulata* (Faggio *et al.*, 2016).

No entanto, deve-se considerar que as concentrações testadas por Faggio e colaboradores (2016) foram pelo menos 67 vezes maiores do que a maior concentração avaliada pelo teste de aPTT do presente estudo. Ainda, destaca-se que a heparina, principal droga terapêutica utilizada como anticoagulante apresenta forte atividade anticoagulante nas concentrações em escalas de µg.mL⁻¹.

Os extratos polissacarídicos obtidos de algumas algas verdes, incluindo *Ulva pertusa*, foram testados em relação ao tempo de tromboplastina parcial ativada por Athukorala e colaboradores (2007). Dentre os extratos polissacarídicos de algas verdes testados, o polissacarídeo de *U. pertusa* foi o que menos teve capacidade de prolongar a coagulação a uma concentração de 100 µg.mL⁻¹, promovendo a coagulação em 55 s. As algas dos gêneros *Monostroma* e *Codium*, as quais não biossintetizam ulvanas, foram as que mais prolongaram o tempo de coagulação, promovendo a coagulação em 200 e 250 s, respectivamente, na concentração de 100 µg.mL⁻¹ (Athukorala *et al.*, 2007).

Os resultados dos testes de aPTT produzidos no presente estudo, mostraram que a ulvana obtida de *U. fasciata*, bem como as frações modificadas por amidação e oxidação-aminação redutiva, não apresentaram atividade anticoagulante nas concentrações entre 10 a 150 µg.mL⁻¹.

Ambas as estratégias de modificação química utilizadas no presente trabalho permitiram a inserção de grupos amino nas ulvanas, resultando na adição de caráter catiônico às ulvanas sulfatadas. Neste contexto, destaca-se que a protamina, um polipeptídeo positivamente carregado, é capaz de reverter a ação anticoagulante da heparina em casos de sobredosagem terapêutica ou ainda após cirurgias que requerem circulação extracorpórea (Ainle *et al.*, 2009; Goldman *et al.*, 1969). Este polipeptídeo reverte o efeito anticoagulante que as heparinas não fracionadas (UFH) causam na trombina e no fator X ativado (Xa), bem como a ação anticoagulante das heparinas de baixa massa molar (LMWH) em relação à trombina, mas não é capaz de reverter o efeito anti-Xa das LMWH (Veen *et al.*, 2011).

A ação anticoagulante da heparina é neutralizada pela protamina em baixas concentrações (Ainle *et al.*, 2009). Os grupos catiônicos de arginina, presentes na protamina, interagem eletrostaticamente com os grupos aniônicos da heparina,

contudo a protamina não é capaz de diferenciar entre sequências ativas e inativas da heparina (Racanelli e Fareed, 1992; Bromfield *et al.*, 2013).

Tendo em vista a ação neutralizante da protamina em relação a heparina, é possível inferir que o caráter catiônico das ulvanas-amida e ulvanas-amina evite ou desfavoreça interações entre estes polissacarídeos e as proteínas do sistema de coagulação. Assim, a ausência de atividade anticoagulante destes polímeros amplia suas possíveis aplicações biotecnológicas, de maneira que as ulvanas-amida podem compor materiais que entram em contato com o organismo humano sem comprometer a coagulação sanguínea, podendo ser utilizadas na engenharia de tecidos, produção de membranas e estruturas 3D que mimetizam a matriz extracelular ou, ainda, como biomateriais para produção de curativos inteligentes (Alves *et al.*, 2012a,b; Zieris *et al.*, 2010; Yang *et al.* 2015; Han *et al.*, 2015; Barros *et al.*, 2013).

Sob outra perspectiva, a adição de grupos aniônicos nas carragenanas quimicamente sulfatadas, promoveu o aumento da atividade anticoagulante das frações KS e KS15, quando comparadas as frações K e K15.

A fração KS na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de plasma apresentou um tempo de coagulação de 71 s, mostrando um aumento de 2,4 vezes o tempo de coagulação da salina e inibiu completamente a coagulação na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Enquanto a fração KS15 foi capaz de prolongar o tempo de coagulação do controle negativo em 3 s na concentração de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$, atingindo a completa inibição da coagulação na concentração de $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Contudo, a fração nativa K e a fração K15 prolongaram o tempo de coagulação em apenas 1,6 s na concentração $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (TABELA 26).

A análise da TABELA 27 mostrou que as frações quimicamente sulfatadas KS e KS15 apresentam os maiores potenciais anticoagulantes. Estimou-se que são necessários apenas 11,6 e $17,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de KS e KS15, respectivamente, para que ambas tripliciem o tempo de coagulação da salina (equivalente a 88 s) (TABELA 27). Enquanto que para as frações K e K15 o tempo de 88 s pode ser alcançado com as concentrações de 478,5 e $475,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, demonstrando a necessidade de se aumentar em 40 vezes as concentrações destas frações para que as mesmas possam atuar como anticoagulantes na mesma intensidade que as frações quimicamente sulfatadas KS e KS15.

A ação anticoagulante de polissacarídeos sulfatados ocorre principalmente por meio da potencialização das serpinas, como a antitrombina (AT) e o cofator II da

heparina (HCII), inibidores naturais das proteases plasmáticas. Os mecanismos pelos quais os polissacarídeos atuam na inibição da coagulação podem constituir alterações alostéricas nas serpinas ou ainda ligações simultâneas com a protease e a serpina (Pomin, 2009).

O teste de aPTT avalia a inibição da coagulação de forma geral, incluindo todas as proteinases plasmáticas, enquanto os testes de TT e PT avaliam a etapa final da coagulação. Desta forma, as frações K, K15, KS e KS15, as quais apresentaram atividade anticoagulante pelo teste de aPTT, também foram avaliadas nos testes de TT e PT.

7.14.2 Testes de tempo de trombina (TT) e tempo de protrombina (PT)

O teste de tempo de trombina (TT) é utilizado para avaliar a última etapa do processo de coagulação, a formação de fibrina mediada pela trombina. O fibrinogênio é convertido em fibrina pela adição da trombina bovina purificada e então é medido o tempo necessário para formar o coágulo. O tempo de protrombina (PT) mede o tempo que o sangue demora para coagular na presença de um excesso de protrombina e cálcio, avaliando a via extrínseca da cascata da coagulação (Alban e Franz, 2001).

As frações K, K15, KS e KS15 foram avaliadas em relação ao seu potencial anticoagulante frente aos ensaios de TT e PT. As frações foram testadas nas concentrações de 10, 50, 100 e 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os tempos de coagulação obtidos para as frações são mostrados na TABELA 28 e TABELA 29, sendo a salina o controle negativo, com tempos de coagulação iguais a $19,7 \pm 0,9$ e $17,4 \pm 0,1$ segundos e heparina, na concentração de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, o controle positivo, com tempo de coagulação > 100 s. Os tempos de coagulação de cada ensaio são resultantes de triplicatas de um experimento independente.

A avaliação do tempo de trombina das frações obtidas da *kappa*-carragenana mostrou que as frações K e K15 foram pouco ativas no processo de ativação de fibrinogênio em fibrina. No entanto, KS e KS15, na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ alcançaram a inibição total da coagulação pelo teste de TT, demonstrando que as alterações promovidas pela hidrólise da fração KS não afetaram a ação anticoagulante de KS15 na inativação da coagulação na etapa de formação da fibrina (TABELA 28).

TABELA 28 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE UTILIZANDO O ENSAIO TEMPO DE TROMBINA (TT)

Fração	Concentração dos compostos ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			
	10	50	100	150
K	n.d.	$23,2 \pm 1,1$	$28,2 \pm 1,8$	$25,6 \pm 1,8$
K15	$19,2 \pm 0,1$	$21,3 \pm 1,6$	$24,3 \pm 0,8$	$26,0 \pm 2,6$
KS	$34,9 \pm 1,2$	>100	>100	>100
KS15	$28,2 \pm 1,5$	>100	>100	>100

Controle negativo: salina, $19,7 \pm 0,9$ s; Controle positivo: heparina, $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$, >100 s.

Os resultados do teste de PT mostraram que as frações K e K15 não promovem ação anticoagulante por meio da protrombina. Destaca-se ainda, que a fração KS15 teve sua atividade anticoagulante bastante reduzida para a etapa de formação de trombina, quando comparada aos testes de aPTT e TT. A fração KS mostrou prolongar o tempo de coagulação em apenas 28,8 s em relação ao controle negativo (salina, 17,4 s), na concentração de $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de plasma, não tendo alcançado a inibição da coagulação pelo teste de PT.

TABELA 29 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE UTILIZANDO O ENSAIO TEMPO DE PROTROMBINA (PT)

Fração	Concentração dos compostos ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			
	10	50	100	150
K	$17,4 \pm 0,8$	$17,6 \pm 0,7$	$22,1 \pm 0,8$	$19,4 \pm 0,5$
K15	$17,8 \pm 0,1$	$18,2 \pm 0,1$	$21,5 \pm 3,5$	$17,4 \pm 1,0$
KS	$20,4 \pm 1,4$	$28,3 \pm 0,4$	$40,7 \pm 0,8$	$46,2 \pm 1,4$
KS15	$19,6 \pm 0,9$	$20,6 \pm 0,1$	$24,9 \pm 0,2$	$28,1 \pm 1,3$

Controle negativo: salina, $17,4 \pm 0,1$ s; Controle positivo: heparina, $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$, > 100 s.

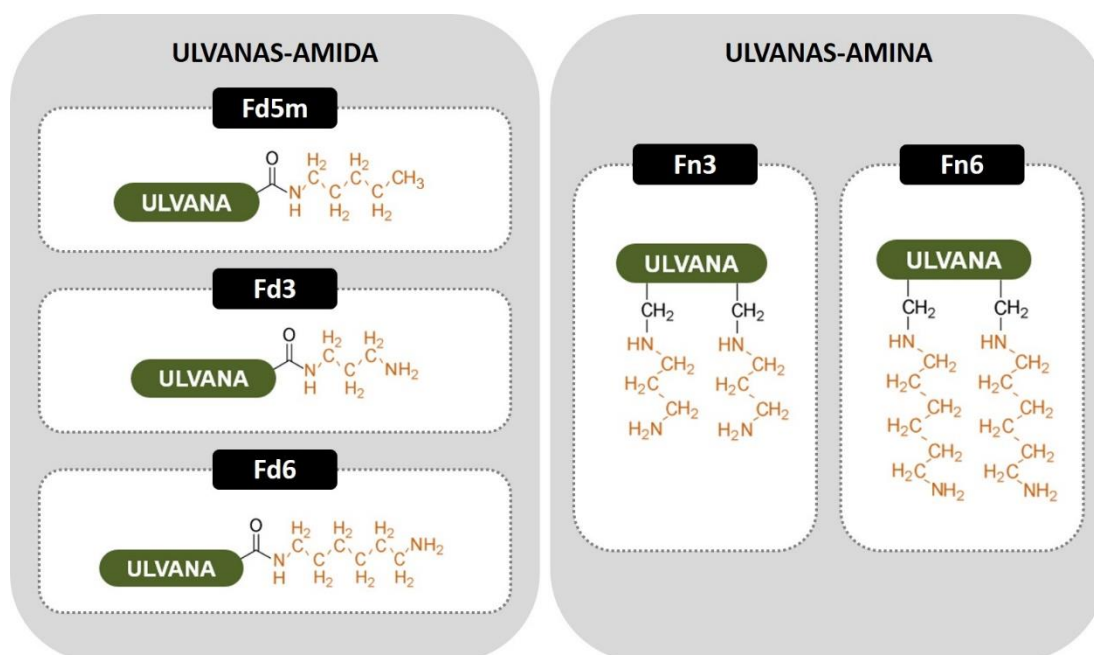
A fração KS mostrou-se ativa em todos os ensaios anticoagulantes, demonstrando o potencial anticoagulante das moléculas sulfatadas. No entanto, é interessante destacar que as atividades biológicas alcançadas por moléculas sulfatadas são dependentes de outras características além da presença dos grupos sulfato, como a posição das substituições e a massa molar (Yermak *et al.*, 2012).

Em conjunto, os dados de atividade anticoagulante mostraram que a ulvana de *U. fasciata* e a kappa-carragenana de *K. alvarezii*, mesmo sendo sulfatadas, não apresentaram os mesmos efeitos na coagulação. Além disso, a inserção de grupos amino na ulvana bem como a semissíntese dos polissacarídeos híbridos não

promoveram ação anticoagulante destes polissacarídeos. Assim, modificações químicas de ulvana via amidação e oxidação-aminação reductiva podem constituir estratégias de modificação que não restrinjam o uso destes polímeros em sistemas biológicos no que concerne aos efeitos anticoagulantes.

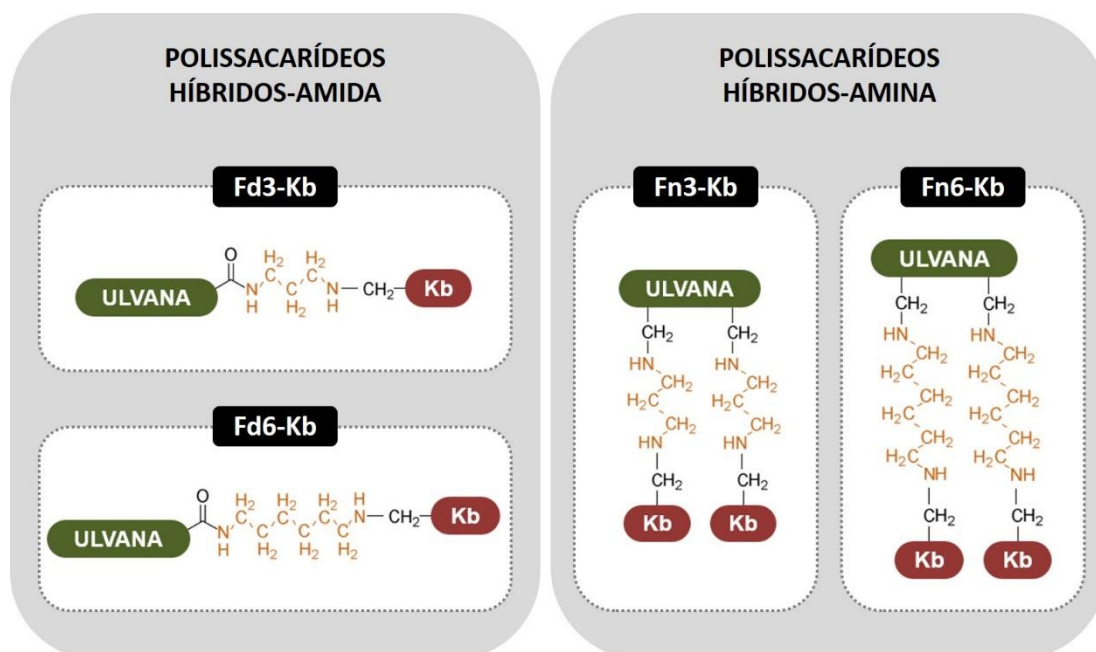
8 CONCLUSÕES

- Foram obtidos e caracterizados 9 derivados inéditos a partir da ulvana extraída da alga verde *U. fasciata*.
- As reações de amidação e de oxidação-aminação reductiva permitiram a obtenção de 5 derivados inéditos, sendo 3 derivados ulvana-amida e 2 derivados ulvana-amina, representados pelos esquemas abaixo:



- Durante o processo de otimização das reações de amidação foi possível obter ulvanas-amida com diferentes graus de amidação a partir da variação do pH reacional e dos equivalentes de EDC e NHS.

- O estudo das condições de amidação com 1,3-diaminopropano mostrou que melhores taxas de amidação da ulvana são obtidas quando se utiliza excesso de pelo menos 1,25 miliequivalente de NHS em relação à EDC.
- A partir da ulvana e da *kappa*-carragenana, dois polissacarídeos naturalmente sulfatados estruturalmente distintos e obtidos de macroalgas marinhas, foram semissintetizados e caracterizados 4 polissacarídeos híbridos inéditos, representados pelos esquemas abaixo:



- O processo de otimização das reações de aminação redutiva da ulvana-amida Fd3 com *kappa*-carrabiose demonstrou a possibilidade de promover as ligações covalentes em meios reacionais compostos por água/metanol nas proporções 1:3, 1:1 e 1:0.
- Utilizando a condição de aminação redutiva em meio aquoso, sem adição de solvente, foi possível promover a ligação de todas as extremidades *N*-(3'-aminopropil)-amida da ulvana-amida Fd3 à *kappa*-carrabiose, resultando no polissacarídeo 100% híbrido Fd3-Kb, o qual apresentou todas as unidades monossacarídicas amidadas (46% das unidades de ácido urônico) ligadas à *kappa*-carrabiose.

- As ulvanas nativa e modificadas via amidação mostraram baixa capacidade de alterar o metabolismo de fibroblasto normal humano MRC-5, ao passo que reduziram em média 30% da atividade metabólica das células de melanoma metastático humano WM9, sugerindo que a ulvana F obtida de *U. fasciata* e seus derivados ulvana-amida apresentaram citotoxicidade seletiva para as células de linhagem tumoral WM9.
- O caráter catiônico dos grupos amino inseridos nas ulvanas modificadas evita ou desfavorece interações entre estes polissacarídeos e as proteínas do sistema de coagulação. Assim, a ausência de atividade anticoagulante destes polímeros amplia suas possíveis aplicações biotecnológicas, de maneira que as ulvanas-amida podem compor biomateriais que não comprometem o sistema de coagulação sanguínea.

9 PERSPECTIVAS

- Os derivados amida produzidos no presente trabalho trazem perspectivas para aperfeiçoar o potencial antitumoral das ulvanas por meio da produção de polissacarídeos conjugados a fármacos antitumorais.
- Os derivados obtidos ainda podem ser avaliados em relação a outras atividades biológicas como antiviral, antioxidante, anti-inflamatória, entre outras.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MAGID, A. F.; CARSON, K. G.; HARRIS, B. D.; MARYANOFF, C. A.; SHAH, R. D. Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 61, p. 3849-3862, 1996.
- ABIRAMI, R.G.; KOWSALYA, S. Anticancer activity of methanolic and aqueous extract of *Ulva fasciata* in Albino mice. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 4, p. 681-684, 2012.
- ADAMS, G. A. Complete acid hydrolysis. In: *Methods in Carbohydrate Chemistry*, v. 5, p. 269-276, 1965.
- ADRIEN, A.; BONNET, A.; DUFOUR, D.; BAUDOUIN, S.; MAUGARD, T.; BRIDIAU, N. Pilot production of ulvans from *Ulva* sp. and their effects on hyaluronan and collagen production in cultured dermal fibroblasts. *Carbohydrate Polymers*, v. 157, p. 1306-1314, 2017.
- AINLE, F.; PRESTON, R. J. S.; JENKINS, V.; NEL, H. J.; JOHNSON, J. A.; SMITH, O. P.; WHITE, B.; FALLON, P. G.; O'DONNELL, J. S. Protamine sulfate down-regulates thrombin generation by inhibiting factor V activation. *Blood*, v. 114, p. 1658-1665, 2009.
- ALBAN, S.; FRANZ, G. Partial synthetic glucan sulfates as potential new antithrombotics: a review. *Biomacromolecules*, v. 2, p. 354-361, 2001.
- ALGAE BASE, www.algaebase.org/. Acesso em: mai. 2017.
- ALVES, A.; DUARTE, A.R.C.; MANO, J.F.; SOUSA, R.A.; REIS, R.L. PDLLA enriched with ulvan particles as a novel 3D porous scaffold targeted for bone engineering. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 65, p. 32-38, 2012a.
- ALVES, A.; PINHO, E. D.; NEVES, N. M.; SOUSA, R. A.; REIS, R. L. Processing ulvan into 2D structures: Cross-linked ulvan membranes as new biomaterials for drug delivery applications. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 426, p. 76-81, 2012b.
- ALVES, A.; SOUSA, R. A.; REIS, R. L. A practical perspective on ulvan extracted from green algae. *Journal of Applied Phycology*, v. 25, p. 407-424, 2013a.
- ALVES, A.; SOUSA, R. A.; REIS, R. L. *In Vitro* Cytotoxicity Assessment of Ulvan, a Polysaccharide Extracted from Green Algae. *Phytotherapy Research*, v. 27, p. 1143-1148, 2013b.
- ALVES, A.; SOUSA, R. A.; REIS, R. L. Processing of degradable ulvan 3D porous structures for biomedical applications. *Journal of biomedical materials research A*, v. 10 1A, p. 998-1006, 2013c.

ANDRÈS, E.; MOLINARI, J.; PÉTERSZEGI, G.; MARIKO, B.; RUSZOVA, E.; VELEBNY, V.; FAURY, G.; ROBERT, L. Pharmacological properties of rhamnose-rich polysaccharides, potential interest in age-dependent alterations of connective tissues. *Pathologie Biologie*, v. 54, p. 420-425, 2006.

ARAKI, C.; HIRASE, S. Studies on the Chemical Constitution of Agar-agar. XVII Isolation of Crystalline Agarobiose Dimethylacetal by Partial Methanolysis of Agar-agar. *Bulletin of The Chemical Society of Japan*, v. 27, p. 109-112, 1954.

ARAÚJO, C. A. Modificações químicas em carragenanas: estudo comparativo de diversos padrões de sulfatação na atividade anticoagulante. 124 p. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

ARAÚJO, C. A.; NOSEDA, M. D.; CIPRIANI, T.; GONÇALVES, A. G.; DUARTE, M.E.R.; DUCATTI, D.R.B. Selective sulfation of carrageenans and the influence of sulfate regiochemistry on anticoagulant properties. *Carbohydrate Polymers*, v. 91, p. 483-491, 2013.

ATHUKORALA, Y.; LEE, K. W.; KIM, S. K.; JEON, Y. J. Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 1711–1716, 2007.

BALDWIN, A. D; KIICK, K. L. Polysaccharide-Modified Synthetic Polymeric Biomaterials. *Biopolymers (Pept Sci)*, v. 94, p. 128-140, 2010.

BARROS, A. A. A.; ALVES, A.; NUNES, C.; COIMBRA, M A.; PIRES, R. A.; REIS, R. L.; Carboxymethylation of ulvan and chitosan and their use as polymeric components of bone cements. *Acta Biomaterialia*, v. 9, p. 9086-9097, 2013.

BeMILLER, J. N. Acid-catalyzed hydrolysis of glycosides. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, v. 22, p. 25-108, 1967.

BHATTACHARYA, A.; MISRA, P. Grafting: a versatile means to modify polymers Techniques, factors and applications. *Progress in Polymer Science*, v. 29, p. 767-814, 2004.

BHATTACHARYA, A.; RAY, P. Basic features and techniques. In: BHATTACHARYA, A.; RAWLINS, J. W. e RAY, P. (Eds.) *Polymer grafting and crosslinking*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, p. 1-5, 2009.

BISHOP, J. R.; SCHUKSZ, M.; ESKO, J.D. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature*, v. 446, p. 1030-1037, 2007.

BOBIN-DUBIGEON, C.; LAHAYE M.; GUILLON F.; BARRY, J-L.; GALLANT, D. J. Factors limiting the biodegradation of *Ulva* sp. cell-wall polysaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 75, p. 341-351, 1997.

BORCH, R. F.; BERNSTEIN, M. D.; DURST, H. D. The cyanohydridoborate anion as a selective reducing agent. *Journal of the American Chemical Society*, v. 93, p. 2897-2904, 1971.

BORCH, R. F.; DURST, H. D. Lithium Cyanohydridoborate, a Versatile New Reagent. *Journal of the American Chemical Society*, v. 91, p. 3996-3997, 1969.

BOYCE, S. T., HAM, R. G. Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *The Journal of investigative dermatology*, v. 81, n. 1 Suppl, p. 33s-40s, 1983.

BRAGD, P.L.; VAN BEKKUM, H.; BESEMER, A.C. TEMPO-mediated oxidation of polysaccharides: survey of methods and applications, *Topics in Catalysis*, v. 27, p. 49-66, 2004.

BREITMAIER, E.; VOELTER, W. Carbon-13 NMR Spectroscopy: High-Resolution Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry. 3rd ed. Weinheim; New York: VCH, 1990.

BRIONES, A. V.; SATO, T. Structural Studies on *iota*-Carrageenan Derived Oligosaccharides and Its Application. *Advances in Chemical Engineering and Science*, v. 4, p. 17-22, 2014.

BROMFIELD, S. M.; WILDE, E.; SMITH, D. K. Heparin sensing and binding – taking supramolecular chemistry towards clinical applications. *Chemical Society Reviews*, v. 42, p. 9184-9195, 2013.

BRYHNI, E. Quantitative differences between polysaccharide compositions in normal differentiated *Ulva mutabilis* and the undifferentiated mutant lumpy. *Phycologia*, v. 17 (2), p. 119-124, 1978.

BULPITT, P.; AESCHLIMANN, D. New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: Preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 47, 152-169, 1999.

CAMPO, V. L. D.; KAWANO, F.; SILVA JR., D. B.; CARVALHO, I. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review. *Carbohydrate Polymers*, v. 77, p. 167-180, 2009.

CARPITA, N. C. e SHEA, E. Linkage structure of carbohydrates by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of partially mutilated alditol acetates. In: BIERMANN, C. J. e MCGINNIS, G. D. *Analysis of carbohydrates by GLC and MS*, 2 ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 157-216, 1990.

CASSOLATO, J. E. F. Determinação da estrutura química e atividade biológica de heteroramnanas sulfatadas obtidas de macroalgas verdes (Ulvaes, Chlorophyta). 183 p. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

CASSOLATO, J. E. F.; NOSEDA, M. D.; PUJOL, C. A.; PELLIZZARI, F. M.; DAMONTE, E. B.; DUARTE, M. E. R. Chemical structure and antiviral activity of the sulfated heterorhamnan isolated from the green seaweed *Gayralia oxysperma*. *Carbohydrate Research*, v. 343, p. 3085–3095, 2008.

CASTRO, R.; PIAZZON, M.C.; ZARRA, I.; LEIRO, J.; NOYA, M.; LAMAS, J. Stimulation of turbot phagocytes by *Ulva rigida* C. Agardh polysaccharides. *Aquaculture*, v. 254, p. 9-20, 2006.

CASTRO, R.; ZARRA, I.; LAMAS, J. Water-soluble seaweed extracts modulate the respiratory burst activity of turbot phagocytes. *Aquaculture*, v. 229, p. 67-78, 2004.

CEREZO, A.S. The carrageenan system of *Gigartina skottsbergii* S. et G. Part I. Studies on a fraction of *kappa*-carrageenan. *Journal of the Chemical Society, (C)*, p. 992-997, 1967.

CHEJARA, D. R.; KONDAVEETI, S.; PRASAD, K.; SIDDHANTA, A. K. Studies on the structure–property relationship of sodium alginate based thixotropic hydrogels. *RSC Advances*, v. 3, p. 15744-15751, 2013.

CHHATBAR, M. U.; MEENA, R.; PRASAD, K.; CHEJARA, D. R.; SIDDHANTA, A. K. Microwave-induced facile synthesis of water-soluble fluorogenic alginic acid derivatives. *Carbohydrate Research*, v. 346, p. 527-533, 2011.

CHHATBAR, M. U.; PRASAD, K.; CHEJARA, D. R.; SIDDHANTA, A. K. Synthesis of sodium alginate based sprayable new soft gel system. *Soft Matter*, v. 8, p. 1837-1844, 2012.

CHEN, W.; GU, L.; ZHANG, W.; MOTARI, E.; CAI, L.; STYSLINGER, T.J.; WANG, P.G. L-Rhamnose Antigen: A Promising Alternative to r-Gal for Cancer Immunotherapies. *ACS Chemical Biology*, v. 6, p. 185-191, 2011.

CIANCIA, M.; NOSEDA, M. D.; MATULEWICZ, M. C.; CEREZO, A. S. Alkali modification of carrageenans: Mechanism and kinetics in the *kappa*/*iota*-, *mu*/*nu*- and *lambda*-series. *Carbohydrate Polymers*, v. 20, p. 95–98, 1993.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, v. 131, p. 209-217, 1984.

COLLINS, P.; FERRIER, R. Reactions and products of reactions at the anomeric centre. In: _____. (Ed.) *Monosaccharides: the chemistry and their roles in natural products*. Wiley, New York, p. 60-188, 1995.

COLODI, F. G. Estrutura química e atividade antiviral dos produtos de hidrólise redutiva parcial de galactanas sulfatadas do tipo DL-híbrida isoladas da alga *Cryptonemia seminervis* (Halymeniales, Rhodophyta) (p. 163). Dissertação de Mestrado, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 163 p., 2011.

COLSON, P., JENNINGS, H. J., AND SMITH, J. C. P. Composition, sequence, and conformation of polymers and oligomers of glucose as reveal by carbon-13 nuclear magnetic resonance. *Journal of the American Chemistry Society*, 96, 8081-8087, 1974.

CONRAD, H. E. The acid lability of the glycosidic bonds of L-iduronic acid residues in glycosaminoglycans. *Biochemical Journal*, v. 191, p. 355-363, 1980.

COOPER, S.L.; VISSER, S.A.; HERGENROTHER, R.W.; LAMBA, N.M.K. Classes of materials used in medicine: polymers. In: Ratner, B.D.; Hoffman, A.S.; Schoen, F.J.; Lemons, J.E. Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. Elsevier Academic Press. 2 ed., 2004.

COSERI, S.; BILIUTA, G.; SIMIONESCU, B. C.; STANA-KLEINSCHEK, K.; RIBITSCHD, V.; HARABAGIU, V. Oxidized cellulose - Survey of the most recent achievements. Carbohydrate Polymers, v. 93, p. 207-215, 2013.

COSTA, C.; ALVES, A.; PINTO, P. R.; SOUSA, R. A.; SILVA, E. A. B.; REIS, R. L.; RODRIGUES, A. E. Characterization of ulvan extracts to assess the effect of different steps in the extraction procedure. Carbohydrate Polymers, v. 88, p. 537-546, 2012.

COSTA, L.S.; FIDELIS, G. P.; CORDEIRO, S. L.; OLIVEIRA, R. M.; SABRY, D. A.; CÂMARA, R. B. G.; NOBRE, L. T. D. B.; COSTA, M.S.S.P.; ALMEIDA-LIMA, J.; FARIAS, E. H. C.; LEITE, E. L.; ROCHA, H. A. O. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. Biomedicine e Pharmacotherapy, v. 64. P. 21-28, 2010.

CUMPSTEY, I. Chemical Modification of Polysaccharides. ISRN Organic Chemistry, Hindawi Publishing Corporation, Article ID 417672, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/417672>. Acesso em: 06.10.2013.

DANIZSHEFSKY, I.; SISKOVIC, E. Conversion of carboxyl groups of mucopolysaccharides into amides of amino acid esters. Carbohydrate Research, v. 16, p. 199-205, 1971.

DE RUITER, G. A.; RUDOLPH, B. Carrageenan biotechnology. Trends in Food Science & Technology, v, 8, p. 389-395, 1997.

DENO, N. C.; NEWMAN, M. S. Mechanism of Sulfation of Alcohols. Journal of the American Chemical Society, v. 72 (9), p. 3852-3856, 1950.

DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the sulphated ester of sulphated polysaccharide. Biochemical Journal, v. 84, p. 106-110, 1962.

DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, D. G.; NOSEDA, M. D.; TULIO, S.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B. Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication in vitro. Phytomedicine, v. 8, (1), p. 53-58, 2001.

DUARTE, M.E.R.; CAUDURO, J.P.; NOSEDA, M.D.; GOLÇALVEZ, A.G.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B; CEREZO, A.S. The structure of the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity. Relation between structure and antiviral activity in agarans. Carbohydrate Research, Amsterdam, v. 339, p. 335-347, 2004.

DUBOIS, M.K.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, v. 28, p. 350-356, 1956.

DUCATTI, D.R.B; COLODI, F.G.; GONÇALVES, A.G.; DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, M.D. Production of agaro- and carraoligosaccharides by partial acid hydrolysis of galactans. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 21, p. 296-304, 2011.

EL-BAKY, H.H.A.; EL BAZ, F.K.; EL BAROTY, G.S. Potential biological properties of sulphated polysaccharides extracted from the macroalgae *Ulva lactuca* L. *Academic Journal of Cancer Research*, v. 2, p. 1-11, 2009.

ELCHINGER, P-H.; FAUGERAS, P-A.; BOENS, B.; BROUILLETTE, F.; MONTPLAISIR, D.; ZERROUKI, R.; LUCAS, R. Polysaccharides: the click chemistry impact. *Polymers*, v. 3, p. 1607, 2011.

ESTEVEZ, J.M.; CIANCIA, M.; CEREZO, A.S. DL-Galactan hybrids and agarans from gametophytes of the red seaweed *Gymnogongrus torulosus*. *Carbohydrate Research*, Amsterdam, v. 331, p. 27-41, 2001.

ESTEVEZ, J. M.; CIANCIA, M.; CEREZO, A. S. The system of galactans of the red seaweed, *Kappaphycus alvarezii*, with emphasis on its minor constituents. *Carbohydrate Research*, v. 339, p. 2575-2592, 2004.

FAGGIO, C.; PAGANO, M.; DOTTORE, A.; GENOVESE, G.; MORABITO, M. Evaluation of anticoagulant activity of two algal polysaccharides. *Natural Product Research*, v. 30, p. 1934-1937, 2016.

FARIAS, E. H. C.; POMIN, V. H.; VALENTE, A. P.; NADER, H. B.; ROCHA, H. A. O.; MOURÃO, P. A. S. A preponderantly 4-sulfated, 3-linked galactan from the green alga *Codium isthmocladum*. *Glycobiology*, v. 18 (3), p. 250-259, 2008.

FILISSETTI-COZZI, T.M.C.C.; CARPITA, N.C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry*, v. 197, p. 157-162, 1991.

FOLLAIN, N.; MONTANARI, S.; JEACOMINE, I.; GAMBARELLI, S. VIGNON, M.R. Coupling of amines with polyglucuronic acid: Evidence for amide bond formation. *Carbohydrate Polymers*, v. 74, p. 333-343, 2008.

FOX, A.; STEPHEN, L. M.; GILBART, L. Preparation of alditol acetates and their analysis by gas chromatography (GC) and mass spectrometry (MS). In: BIERMANN, C. J. e MCGINNIS, G. D. *Analysis of carbohydrates by GLC and MS*, 2 ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 77-117, 1990.

FRANSSON, L-A. Periodate oxidation of L-iduronic acid residues in dermatan sulphate. *Carbohydrate Research*, v. 36, p. 339-348, 1974.

FREITAS, M. B.; FERREIRA, L. G.; HAWERROTH, C.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; STADNIK, M. J. Ulvans induce resistance against plant pathogenic fungi independently of their sulfation degree. *Carbohydrate Polymers*, v. 133, p. 384-390, 2015.

GAREGG, P. J.; LINDBERG, B.; KONRADSSON, P.; KVARNSTRÖM, I. Hydrolysis of glycosides under reducing conditions. *Carbohydrate Research*, v. 176, p. 145-148, 1988.

GOODARZI, N.; VARSHOCHIAN, R.; KAMALINIA, G.; ATYABI, F.; DINARVAND, R. A review of polysaccharide cytotoxic drug conjugates for cancer therapy. *Carbohydrate Polymers*, v. 92, p. 1280-1293, 2013.

GOLDMAN, B. S.; JOISON, J.; AUSTEN, W. G. Cardiovascular Effects of Protamine Sulfate. *The Annals Of Thoracic Surgery*, v. 7, p. 459-471, 1969.

GONÇALVES, A. G.; DUCATTI, D. R. B.; PARANHA, R. G.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D. Positional isomers of sulfated oligosaccharides obtained from agarans and carrageenans: preparation and capillary electrophoresis separation. *Carbohydrate Research*, v. 340, p. 2123-2134, 2005.

GONÇALVES, A.G.; DUCATTI, D.R.B.; DUARTE, M.R.E.; NOSEDA, M.D., Sulfated and pyruvylated disaccharide alditols obtained from a red seaweed galactan: ESIMS and NMR approaches. *Carbohydrate Research*, v. 337, p. 2443-2453, 2002.

GORIN, P.A.J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, v. 38, p. 13-104, 1981.

GOVINDAN, S.M.; THOMAS, J.; KURUP, G.M. *In vitro* antioxidant and antitumor activity of polysaccharide isolated from *Ulva fasciata*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, v. 3, p. 238-246, 2012a.

GOVINDAN, S.M.; THOMAS, J.; PRATHEESH, P.T.; KURUP, G.M. *Ex vivo* anticoagulant activity of the polysaccharide isolated from *Ulva fasciata*. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*, v. 1, p. 1940197, 2012b.

GROTH, I.; GRÜNEWALD, N.; ALBAN, S. Pharmacological profiles of animal- and nonanimal-derived sulfated polysaccharides-comparison of unfractionated heparin, the semisynthetic glucan sulfate PS3, and the sulfated polysaccharide fraction isolated from *Delesseria sanguinea*. *Glycobiology*, v. 19, p. 408-417, 2009.

GUPTA, B.; TUMMALAPALLI, M.; DEOPURAA, B. L.; ALAM, M. S. Functionalization of pectin by periodate oxidation. *Carbohydrate Polymers*, v. 98, p. 1160-1165, 2013.

GUTHRIE, R. D.; The "dialdehydes" from the periodate oxidation of carbohydrates. In: Wolfrom; M.L. Tipson, R.S. (Eds.) *Advances in Carbohydrate Chemistry*. Academic Press Inc., London, v. 16, p. 105-158, 1961.

HAIJIN, M.; XIAOLU, J.; HUASHI, G. A κ-carrageenan derived oligosaccharide prepared by enzymatic degradation containing anti-tumor activity. *Journal of Applied Phycology*, v. 15, p. 297-303, 2003.

HAN, H. S.; THAMBI, T.; CHOI, K. Y.; SON, S.; KO, H.; LEE, M. C.; JO, D-G.; CHAE, Y. S.; KANG, Y. M.; LEE, J. Y.; PARK, J. H. Bioreducible Shell-Cross-Linked Hyaluronic Acid Nanoparticles for Tumor-Targeted Drug Delivery. *Biomacromolecules*, v. 16, p. 447-456, 2015.

HARADA, N.; MAEDA, M. Chemical Structure of Antithrombin-active Rhamnan Sulfate from *Monostroma nitidum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 62(9), p. 1647-1652, 1998.

HASEGAWA, T.; UMEDA, M.; NUMATA, M.; LI, C.; BAE, A.-H.; FUJISAWA, T.; HARAGUCHI, S.; SAKURAI, K.; SHINKAI, S. 'Click Chemistry' on polysaccharides: A convenient, general, and monitorable approach to develop (1-3)- β -D-glucans with various functional appendages. *Carbohydrate Research*, v. 341, p. 35-40, 2006.

HSU, M. Y., ELDER, D., HERLYN, M. M. Melanoma: the Wistar Melanoma (WM) cell lines. In: MASTERS, J. R.; PALSSON, B. (Ed.). *Human cell Culture*. Netherlands: Springer, p. 259-274, 2002.

INOUE, Y.; NAGASAWA, K. On the reaction of *N*-acetylchondrosine, *N*-acetylchondrosine 6-sulfate, chondroitin 6-sulfate, and heparin with 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide. *Carbohydrate Research*, v. 111, p. 113-125, 1982.

IZUMI, K. Structural analysis of agar-type polysaccharides by NMR spectroscopy. *Biochimica Biophysica Acta*, v. 320, p. 311-317, 1973.

JACOBS, J. P.; JONES, C. M.; BAILLE, J. P. Characteristics of a Human Diploid Cell Designated MRC-5. *Nature*, v. 227, p. 168-170, 1970.

JAULNEAU, V.; LAFITTE, C.; JACQUET, C.; FOURNIER, S.; SALAMAGNE, S.; BRIAND, X.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.-T.; DUMAS, B. Ulvan, a Sulfated Polysaccharide from Green Algae, Activates Plant Immunity through the Jasmonic Acid Signaling Pathway. *Hindawi Publishing Corporation, Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2010 (525291), p. 1-11, 2010.

JOUANNEAU, D.; BOULENGUER, P.; MAZOYER, J.; HELBERT, W. Complete assignment of ^1H and ^{13}C NMR spectra of standard neo-iota-carrabiose oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, v. 345, p. 547-551, 2010.

KAEFFER, B.; BÉNARD, C.; LAHAYE, M.; BLOTTIÈRE, H. M.; CHERBUT, C. Biological Properties of Ulvan, a New Source of Green Seaweed Sulfated Polysaccharides, on Cultured Normal and Cancerous Colonic Epithelial Cells. *Planta Medica*, v. 64, p. 527-531, 1999.

KANG, H.A.; JEON, G.J.; LEE, M.Y.; YANG, J.W. Effectiveness test of alginate-derived polymeric surfactants. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 77, p. 205-208, 2002.

KHAN, W.; HOSSEINKHANI, H.; ICKOWICZ, D.; HONG, P.-D.; YU, D.-S.; DOMB, A. J. Polysaccharide gene transfection agents. *Acta Biomaterialia*, v. 8, p. 4224-4232, 2012.

KHORANA, H. G. The chemistry of carbodiimides. *Chemical Reviews*, v. 53, p. 145-166, 1953.

KIKIONIS, S.; IOANNOU, E.; TOSKAS, G.; ROUSSIS, V. Electrospun biocomposite nanofibers of ulvan/PCL and ulvan/PEO. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 132 (42153), p. 1-5, 2015.

KLOAREG, B.; QUATRANO, R.S. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of matrix polysaccharides. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, Winchester, v. 26, p. 259-315, 1988.

KNUTSEN, S. H.; GRASDALEN, H. The use of neocarrabiose oligosaccharides with different length and sulphate substitution as model compounds for ¹H-NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, v. 229, p. 233-244, 1992.

KNUTSEN, S. H.; MYSLABODSKI, D. E.; LARSEN, B.; USOV, A. I. A modified system of nomenclature for red algal galactans. *Botanica Marina*, v. 37, p. 163-169, 1994.

KOBAYASHI, E.; LI, T-P.; ENOKI, T.; TOMINAGA, T.; SAGAWA, H.; KATO, I. Remedies. US6518302, Feb. 11, 2003.

KOSHIDA, S.; SUDA, Y.; ARANO, A.; SOBEL, M.; KUSUMOTO, S. An efficient method for the assembly of sulfated oligosaccharides using reductive amination. *Tetrahedron Letters*, v. 42, p. 1293-1296, 2001.

KRAAN, S., Algal polysaccharides, novel applications and outlook, in: Chang, C.-F. (Ed.), *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*, InTech, Rijeka, Croatia, pp. 489-532, 2012.

KRISTIANSEN, K.; POTTHAST, A.; CHRISTENSEN, B.E. Periodate oxidation of polysaccharides for modification of chemical and physical properties. *Carbohydrate Research*, v. 345, p. 1264-1271, 2010.

KUO J-W, SWANN DA, PRESTWICH GD. Chemical modification of hyaluronic acid by carbodiimides. *Bioconjugate Chemistry*, v. 2, p. 232-241, 1991.

KURZER, F., DOURAGHI-ZEDEH, K. Advances in the chemistry of carbodiimides. *Chemical Reviews*, v. 67, p. 107-152, 1967.

LAHAYE, M. NMR spectroscopic characterization of oligosaccharides from two *Ulva rigida* samples (Ulvales, Chlorophyta) degraded by a lyase. *Carbohydrate Research*, v. 314, p. 1-12, 1998.

LAHAYE, M.; AXELOS, M. A. V. Gelling properties of water-soluble polysaccharides from proliferating marine green seaweeds (*Ulva* spp.). *Carbohydrate Polymers*, v. 22, p. 261-265, 1993.

LAHAYE, M.; BRUNEL, M.; BONNIN, E. Fine chemical structure analysis of oligosaccharides produced by an ulvan-lyase degradation of the water-soluble cell-wall polysaccharides from *Ulva* sp. (Ulvales, Chlorophyta). *Carbohydrate Research*, v. 304, p. 325-333, 1997.

LAHAYE, M.; CIMADEVILLA, E.A.-C.; KUHLENKAMP, R.; QUEMENER, B.; LOGNONÉ, V.; DION, P. Chemical composition and ^{13}C NMR spectroscopic characterization of ulvans from *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology*, v. 11, p. 1-7, 1999.

LAHAYE, M.; INIZAN, F.; VIGOUROUX, J. NMR analysis of the chemical structure of ulvan and of ulvan-boron complex formation. *Carbohydrate Polymers*, v. 36, p. 239-249, 1998.

LAHAYE, M.; RAY, B. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva* "rigida" (Ulvales, Chlorophyta) – NMR analysis of ulvan oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, v. 283, p. 161-173, 1996.

LAHAYE, M.; ROBIC, A. Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweed. *Biomacromolecules*, v. 8, p. 1765-1774, 2007.

LAWSON, C. J.; REES, D. A.; STANCIOFF, D. J.; STANLEY, N. F. Carrageenans. Part VIII Repeating Structures of Galactan Sulphates from *Furcellaria fastigiata*, *Gigartina canaliculata*, *Gigartina chamissoi*, *Gigartina atropurpurea*, *Ahnfeltia durvillaei*, *Gymnogongrus furcellatus*, *Euclima cottonii*, *Euclima spinosum*, *Euclima isiforme*, *Euclima uncinatum*, *Aghardhiella tenera*, *Pachymenia hymantophora*, and *Gloiopeltis cervicornis*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, v. 19, p. 2177-2182, 1973.

LEIBOVITZ, A. The Growth and Maintenance of Tissue-Cell Cultures in Free Gas Exchange with the Atmosphere. *American journal of hygiene*, v. 78, p. 173-80, 1963.

LEIRO, J.M.; CASTRO, R.; ARRANZ, J.A.; LAMAS J. Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. *International Immunopharmacology*, v. 7, p. 879-888, 2007.

LEÓDIDO, A. C. M.; COSTA, L. E. C.; ARAÚJO, T. S. L.; COSTA, D. S.; SOUSA, N. A.; SOUZA, L. K. M.; SOUSA, F. B. M.; FILHO, M. D. S.; VASCONCELOS, D. F. P.; SILVA, F. R. P.; NOGUEIRA, K. M.; ARAÚJO, A. R.; BARROS, F. C. N.; FREITAS, A. L. P.; MEDEIROS, J. V. R. Anti-diarrhoeal therapeutic potential and safety assessment of sulphated polysaccharide fraction from *Gracilaria intermedia* seaweed in mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 97, p. 34-45, 2017.

LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J.; SVENSSON, S. Specific Degradation of Polysaccharides, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, v. 31, p. 185-240, 1975.

LOVEGROVE, A.; EDWARDS, C. H.; NONI, I. D.; PATEL, H.; EL, S. N.; GRASSBY, T.; ZIELKE, C.; ULMUS, M.; NILSSON, L.; BUTTERWORTH, P. J.; ELLIS, P. R.; SHEWRY, P. R. Role of polysaccharides in food, digestion, and health. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, v. 57 (2), p. 237-253, 2017.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A. L.; RANDALL, K.L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v. 193, p. 265, 1951.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. C. Caracterização de polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica. Rio de Janeiro: E-papers, 2001. 366 p. (Série Instituto de Macromoléculas).

MANIVASAGAN, P.; OH, J. Marine polysaccharide-based nanomaterials as a novel source of nanobiotechnological applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 82, p. 315-327, 2016.

MAO, W.; ZANG, X.; LI, Y.; ZHANG, H. Sulfated polysaccharides from marine green algae *Ulva conglobata* and their anticoagulant activity. *Journal of Applied Phycology*, v. 18, p. 9-15, 2006.

MASARIN, F.; CEDENO, F. R. P.; CHAVEZ, E. G. S.; OLIVEIRA, L. E.; GELLI, V. C.; MONTI, R. Chemical analysis and biorefinery of red algae *Kappaphycus alvarezii* for efficient production of glucose from residue of carrageenan extraction process, *Biotechnology for Biofuels*, v. 9 (122), p.1-12, 2016.

MASSARELLI, I.; MURGIA, L.; BIANUCCI, A.M.; CHIELLINI, F.; CHIELLINI, E. Understanding the Selectivity Mechanism of the Human Asialoglycoprotein Receptor (ASGP-R) toward Gal- and Mantype Ligands for Predicting Interactions with Exogenous Sugars. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 8, p. 13-28, 2007.

MATULEWICZ, M. C.; CIANCIA, M.; NOSEDA, M. D.; CERREZO, A. S. Methylation analysis of carrageenans from tetrasporic and cystocarpic stages of *Gigartina skottsbergii*. *Phytochemistry*, v. 29, p. 3407-3410, 1990.

MAYAKRISHNANA, V.; KANNAPPANB, P.; ABDULLAHA, N.; AHMED, A. B. A.; Cardioprotective activity of polysaccharides derived from marine algae: An overview. *Trends in Food Science and Technology*, v. 30, p. 98-104, 2013.

McHUGH, D. J. A guide to the seaweed industry: FAO fisheries technical paper, n. 441, p. 1-72, Rome: FAO, 2003.

MEISSEN, J.K.; SWEENEY, M.D.; GIRARDI, M.; LAWRENCE, R.; ESKO, J.D.; LEARY, J.A. Differentiation of 3-O-Sulfated Heparin Disaccharide Isomers: Identification of Structural Aspects of the Heparin CCL2 Binding Motif. *J. American Society for Mass Spectrometry*, v. 20, p. 652-657, 2009.

MELDAL, M.; TORNØE, C.W. Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Chem. Rev.*, v. 108, p. 2952-3015, 2008.

MENDES, G. S.; DUARTE, M. E. R.; COLODI, F. G.; NOSEDA, M. D.; FERREIRA, L. G.; BERTÉ, S. D.; CAVALCANTI, J. F.; SANTOS, N.; ROMANOS, M. T. V. Structure and anti-metapneumovirus activity of sulfated galactans from the red seaweed *Cryptonemia seminervis*. *Carbohydrate Polymers*, v. 101, p. 313- 323, 2014.

MESTECKINA, N.M.; SHCHERBUKHIN, V.D. Sulfated polysaccharides and their anticoagulant activity: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 46 (3), p. 267-273, 2010.

MICHALAK, I.; CHOJNACKA, K. Algae as production systems of bioactive compounds, *Engeneering in Life Sciences*, v. 15, 160-176, 2015.

MILLER, I. J.; FALSHAW, R.; FURNEAUX, R.H. Structural analysis of the polysaccharide from *Pachymenia lusoria* (Cryptonemiaceae, Rhodophyta), *Carbohydrate Research*, Amsterdam, v. 268, p. 219-232, 1995.

MILLER, I.J.; WONG, H.; NEWMAN, R. H. A ^{13}C N.M.R. study of some disaccharides from algal polysaccharides. *Australian Journal of Chemistry*, v. 35(4), p. 853-856, 1982.

MIZRAHY, S.; PEER, D. Polysaccharides as building blocks for nanotherapeutics. *Chem. Soc. Rev.*, v. 41, p. 2623-2640, 2012.

MOJARRADI, H. Coupling of substances containing a primary amine to hyaluronan via carbodiimide-mediated amidation. Independent thesis Advanced level. Department of Biochemistry and Organic Chemistry. Uppsala Universitet, 44 p., 2010.

Mordor Intelligence, 2017. Global Carrageenan Market - Trends and Forecasts: (2017-2022) (Segmented by types, applications, grades and geography), 2017. Acesso em: mai.2017. <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-carrageenan-market-industry>.

MORELLI, A.; BETTI, M.; PUPPI, D.; CHIELLINI, F. Design, preparation and characterization of ulvan based thermosensitive hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, v. 136, p. 1108-1117, 2016.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUTO, S.; NIIMURA, K.; OOHARA, M.; OGUCHI, Y.; MATSUNAGA, K.; HIROSE, K.; KAKUCHI, J.; SUGITA, N.; FURUSHO, T.; YOSHIKUMI, C.; TAKAHASHI, M. Polysaccharides and antiviral drugs containing the same as active agent. US Patent US 5089481, 1992.

NAGASAWA, K.; INOUE, Y.; TOKUYASU, T. An improved method for the preparation of the chondroitin by solvolytic desulfation of chondroitin sulfates. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v. 86, p. 1323-1327, 1979.

NAKAJIMA, N.; IKADA, Y. Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media. *Bioconjugate Chemistry*, v. 6, p. 123-130, 1995.

NECAS, J; BARTOSIKOVA, L. Carrageenan: a review. *Veterinarni Medicina*, v. 58 (4), p. 187-205, 2013.

NOSEDA, M. D.; CERESO, A. S. Room temperature, low-field ^{13}C -NMR spectra of degraded carrageenans: Part 3. Autohydrolysis of a lambda carrageenan and of its alkali-treated derivative. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 15, p. 177-181, 1993.

NOSEDA, M.D. Polissacarídeos sulfatados isolados da fase tetraesporofítica de *Gigartina skottsbergii* (Rhodophyta, Gigartinales). Tese de doutorado. Departamento de Bioquímica da UFPR, 180 p., 1994.

N-TECH RESEARCH. Smart Coatings Markets 2016-2025, 2016. Disponível em: http://ntechresearch.com/market_reports/smart-coatings-markets-2016-2025

O'ROURKE, C.; GREGSON, T.; MURRAY, L.; SADLER, I. H.; FRY, S. C. Sugar composition of the pectic polysaccharides of charophytes, the closest algal relatives of land-plants: presence of 3-O-methyl-D-galactose residues. *Annals of Botany*, v. 116, p. 225-236, 2015.

OEZYUERKEK, Z.; FRANKE, K.; NITSCHKE, M.; SCHULZE, R.; SIMON, F.; EICHHORN, K-J.; POMPE, T.; WERNER, C.; VOIT, B. Sulfated glyco-block copolymers with specific receptor and growth factor binding to support cell adhesion and proliferation. *Biomaterials*, v. 30, p. 1026-1035, 2009.

OCHSENBEIN, P.; BONIN, M.; SCHENK-JOß, K.; EL-HAJJI, M. The ^2So Skew-Boat Conformation in L-Iduronic Acid. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 50, p. 11637-11639, 2011.

PADMANABAN, V.C.; PRASHANT K.P.; RANJITH, M.V.; ASWANI, T.; ASWANI, M.T. Comparative analysis of anti-coagulant potential of marine macro algae. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 5, S1, p. 334-337, 2013.

PAINTER, T. J. Algal Polysaccharides. In: ASPINALL, G. The polysaccharides, v. 2, p. 195-285, 1983.

PANKIEWICZ, R.; ŁĘSKA, B.; MESSYASZ, B.; FABROWSKA, J.; SOŁODUCHA, M.; PIKOSZ, M. First isolation of polysaccharidic ulvans from the cell walls of freshwater algae. *Algal Research*, v. 19, p. 348-354, 2016.

PAPY-GARCIA, D.; BARBIER-CHASSEFIÈRE, V.; ROUET, V.; KERROS, M-E.; KLOCHENDLER, C.; TOURNAIRE, M-C.; BARRITAU, D.; CARUELLE, J-P.; PETIT, E. Nondegradative Sulfation of Polysaccharides. Synthesis and Structure Characterization of Biologically Active Heparan Sulfate Mimetics. *Macromolecules*, v. 38, p. 4647-4654, 2005.

PARADOSSI, G.; CAVALIERI, F.; PIZZOFERRATO, L.; LIQUORI, A. M. A physico-chemical study on the polysaccharide ulvan from hot water extraction of the macroalga *Ulva*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 25, p. 309-315, 1999.

PARADOSSI, G.; CAVALIERI, F.; CHIESSI, E. A Conformational Study on the Algal Polysaccharide Ulvan. *Macromolecules*, v. 35, p. 6404-6411, 2002.

PATEL, S. Therapeutic importance of sulfated polysaccharides from seaweeds: updating the recent findings. *3 Biotech*, v. 2, p. 171-185, 2012.

PAULA, E.J.; PEREIRA, R.T.C.; OHNO, M. Strain selection in *Kappaphycus alvarezii*, var. *alvarezii* (Solieriaceae, Rhodophyta) using tetraspore progeny. *Journal of Applied Phycology*, v. 11, p. 111-121, 1999.

PAULERT, R.; TALAMINI, V.; CASSOLATO, J.E.F.; DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, M.D.; SMANIA JR., A.; STADNIK, M.J. Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from green seaweed *Ulva fasciata* on anthracnose severity and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Plant Diseases and Protection*, v. 116, p. 263-270, 2009.

PENMAN, A.; REES, D. A. Carrageenans. Part XI. Mild oxidative hydrolysis of κ and ι -carrageenans and the characterization of oligosaccharide sulphates. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, v.19, p. 2191-2196, 1973.

PERCIVAL, E.; McDOWELL, R. H. Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. Academic Press Inc., London. p. 73-98, 127-156, 1967.

PESCHEL, D.; ZHANG, K.; FISCHER, S.; GROTH, T. Modulation of osteogenic activity of BMP-2 by cellulose and chitosan derivatives. *Acta Biomaterialia*, v.8, p. 183-193, 2012.

POMIN, V. H. An Overview About the Structure–Function Relationship of Marine Sulfated Homopolysaccharides with Regular Chemical Structures. *Biopolymers*, v. 91 (8), p. 601-609, 2009.

QI, H.; HUANG, L.; LIU, X.; LIU, D.; ZHANG, Q.; LIU, S. Antihyperlipidemic activity of high sulfate content derivative of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Carbohydrate Polymers*, v. 87, p. 1637-1640, 2012.

QI, H.; LIU, X.; MA, J.; ZHANG, Q.; LI, Z. In vitro antioxidant activity of acetylated derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 4(23), p. 2445-2451, 2010.

QI, H.; ZHANG, Q.; ZHAO, T.; HU, R.; ZHANG, K.; LI, Z. In vitro antioxidant activity of acetylated and benzoyleated derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 16, p. 2441-2445, 2006.

QUEMENER, B.; LAHAYE, M.; BOBIN-DUBIGEON, C. Sugar determination in ulvans by a chemical-enzymatic method coupled to high performance anion exchange chromatography. *Journal of Applied Phycology*, v. 9, p. 179-188, 1997.

RACANELLI, A.; FAREED, J. Neutralization of the antithrombotic effects of heparin and FraxiparinR by protamine sulfate. *Thrombosis Research*, v. 68, p. 211-222, 1992.

RAPOSO, M. F. J.; MORAIS, A. M. B.; MORAIS, R. M. S. C. Marine Polysaccharides from Algae with Potential Biomedical Applications, *Marine Drugs*, v. 13, p. 2967-3028, 2015.

RAPOSO, M. F. J.; MORAIS, A. M. M.B.; MORAIS, R. M. S. C. Emergent Sources of Prebiotics: Seaweeds and Microalgae. *Marine Drugs*, v. 14, p. 1-27, 2016.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. 6 ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, p. 344-366, 2001.

RAY, B.; LAHAYE, M. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva "rigida"* (Ulvales, Chlorophyta). Extraction and chemical composition. *Carbohydrate Research*, v. 274, p. 251-261, 1995a.

RAY, B.; LAHAYE, M. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva "rigida"* (Ulvales, Chlorophyta). Chemical structure of ulvan. *Carbohydrate Research*, v. 274, p. 313-318, 1995b.

RINAUDO, M. New amphiphilic grafted copolymers based on polysaccharides, *Carbohydrate Polymers*, v. 83, p. 1338-1344, 2011.

ROBIC, A.; GAILLARD, C.; SASSI, J-F.; LERAT, Y.; LAHAYE, M. Ultrastructure of Ulvan: A Polysaccharide from Green Seaweeds. *Biopolymers*, v. 91 (8), p. 652-664, 2009.

ROBIC, A.; SASSI, J-F.; LAHAYE, M. Impact of stabilization treatments of the green seaweed *Ulva rotundata* (Chlorophyta) on the extraction yield, the physico-chemical and rheological properties of ulvan. *Carbohydrate Polymers*. v. 74, p. 344-352, 2008.

ROCHAS, C.; LAHAYE, M.; YAPHE, W. ¹³C-NMR spectroscopic investigation of agarose oligomers. *Carbohydrate Research*, v. 148, p. 199-207, 1986.

ROCHAS, C.; RINAUDO, M.; VINCENDON, M. Spectroscopic characterization and conformation of oligo kappa carrageenans. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 5, p. 111-115, 1983.

ROPELLATO, J.; CARVALHO, M. M.; FERREIRA, L. G.; NOSEDA, M. D.; ZUCONELLI, C. R.; GONÇALVES, A. G.; DUCATTI, D. R. B.; KENSKI, J. C. N.; NASATO, P. L.; WINNISCHOFER, S. M. B.; DUARTE, M. E. R. Sulfated heterorhamnans from the green seaweed *Gayralia oxysperma*: partial depolymerization, chemical structure and antitumor activity. *Carbohydrate Polymers*, v. 117, p. 476-485, 2015.

SAHA, S.; CHHATBAR, M. U.; MAHATO, P.; PRAVEEN, L.; SIDDHANTA, A. K.; DAS, A. Rhodamine–alginate conjugate as self indicating gel beads for efficient detection and scavenging of Hg²⁺ and Cr³⁺ in aqueous media. *Chemical Communication*, v. 48, p. 1659-1661, 2012.

SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J.; SOUZA, L.M.; CZELUSNIAK, P.A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards from GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. *Carbohydrate Research*, v. 340, p. 731-739, 2005.

SANANDIYA, N. D.; SIDDHANTA, A. K. Facile synthesis of a new fluorogenic metal scavenging interpolymeric diamide based on cellulose and alginic acids. *Carbohydrate Research*, v. 381, p. 93-100, 2013.

SCHAFER, S. E.; STEVENS, E. S. The optical rotation of ordered carrageenans. *Carbohydrate Polymers*, v. 31, p. 19-22, 1996.

SCHANTÉ, C. E.; ZUBER, G. HERLIN, C. VANDAMME, T.F. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, v. 85, p. 469-489, 2011a.

SCHANTÉ, C.; ZUBER, G.; HERLIN, C.; VANDAMME, T. F. Synthesis of *N*-alanyl-hyaluronamide with high degree of substitution for enhanced resistance to hyaluronidase-mediated digestion. *Carbohydrate Polymers*, v. 86, p. 747-752, 2011b.

SEHGAL, D.; VIJAY, I.K. A method for the high efficiency of water-soluble carbodiimide-mediated amidation. *Analytical Biochemistry*, v. 218, p. 87-91, 1994.

SHAO, P.; CHEN, X.; SUN, P. *In vitro* antioxidant and antitumor activities of different sulfated polysaccharides isolated from three algae. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 62, p. 155-161, 2013.

SHIMONAGA, T.; FUJIWARA, S.; KANEKO, M.; IZUMO, A.; NIHEI, S.; FRANCISCO JR., P. B.; SATOH, A.; FUJITA, N.; NAKAMURA, Y.; TSUZUKI, M. Variation in Storage α -Polyglucans of Red Algae: Amylose and Semi-Amylopectin Types in *Porphyridium* and Glycogen Type in *Cyanidium*. *Marine Biotechnology*, v. 9, p. 192-202, 2007.

SIDDHANTA, A. K.; SANANDIYA, N. D.; CHEJARA, D. R.; KONDAVEETI, S. Functional modification mediated value addition of seaweed polysaccharides – a perspective. *RSC Advances*, v. 5, p. 59226-59239, 2015.

SILVA, A. C. R.; FERREIRA, L. G.; DUARTE, M. E. R.; FUJII, M. T.; SANCHEZ, E. F.; NOSEDA, M. D.; FULY, A. L. Protective Effect of the Sulfated Agaran Isolated from the Red Seaweed *Laurencia aldingensis* Against Toxic Effects of the Venom of the Snake, *Lachesis muta*. *Marine Biotechnology* (Print), v. 18, p. 619-629, 2016.

SILVA, A. C. R.; FERREIRA, L. G.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; SANCHEZ, E. F.; FULY, A. L. Sulfated Galactan from *Palisada flagellifera* Inhibits Toxic Effects of *Lachesis muta* Snake Venom. *Marine Drugs*, v. 13, p. 3761-3775, 2015.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X; KIEMLE, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7 ed. LTC Editora, Rio de Janeiro, 2007.

ŠIMKOVIC, I. What could be greener than composites made from polysaccharides? *Carbohydrate Polymers*, v. 74, p. 759-762, 2008.

SINGH, R.; PARIHAR, P.; SINGH, M.; BAJGUZ, A.; KUMAR, J.; SINGH, S.; SINGH, V. P.; PRASAD, S. M. Uncovering Potential Applications of Cyanobacteria and Algal Metabolites in Biology, Agriculture and Medicine: Current Status and Future Prospects, *Frontiers in Microbiology*, v. 8 (515), p. 1-37, 2017.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. Química Orgânica. 7 ed, v. 1 e 2. LTC Editora S.A., Rio de Janeiro, 2002.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. Organic chemistry. 10th ed, International student version, Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons, 2011.

SONG, L.; CHEN, X.; LIU, X.; ZHANG, F.; HU, L.; YUE, Y.; LI, K.; LI, P. Characterization and Comparison of the Structural Features, Immune-Modulatory and Anti-Avian Influenza Virus Activities Conferred by Three Algal Sulfated Polysaccharides. *Marine Drugs*, v. 14 (4), 1-17, 2016.

STEVENSON, T.; FURNEAUX, R. Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae. *Carbohydrate Research*, Amsterdam, v. 210, p. 277-298, 1991.

STEVENSON, T.; FURNEAUX, R. Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae. *Carbohydrate Research*, Amsterdam, v. 210, p. 277-298, 1991.

TADANIER, J.; HALLAS, R.; MARTIN, J. R.; STANASZEK, R. S. 6'-epi-Fortimicins: Observations relevant to the mechanism of the reductive aminations of ketones with sodium cyanoborohydride and ammonium acetate. *Tetrahedron*, v. 37, p. 1309-1316, 1981.

TALARICO, L. B.; ZIBETTI, R. G. M.; FARIA, P. C. S.; SCOLARO, L. A.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactanas from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 34, p. 63-71, 2004.

TALARICO, L. B.; DUARTE, M. E. R.; ZIBETTI, R. G. M.; NOSEDA, M. D.; DAMONTE, E. B. An Algal-Derived DL-Galactan Hybrid is an Efficient Preventing Agent for *in vitro* Dengue Virus Infection. *Planta Medica*, v. 73, p. 1464-1468, 2007.

TALARICO, L. B.; NOSEDA, M. D.; DUCATTI, D. R. B.; DUARTE, M. E. R.; DAMONTE, E. B. Differential inhibition of dengue virus infection in mammalian and mosquito cells by iota-carrageenan. *Journal of General Virology*, v. 92, p. 1332-1342, 2011.

TALARICO, L. B.; PUJOL, C. A.; ZIBETTI, R. G. M.; FARIA, P. C. S.; NOSEDA, M. D.; DUARTE, M. E. R.; DAMONTE, E. B. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. *Antiviral Research*, v. 66, p. 103-110, 2005.

TAYLOR, R. L.; CONRAD, H. E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuranans to monossaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. *Biochemistry*, v. 11, p. 1383-1388, 1972.

TEOTIA, A. Modification of carboxymethyl cellulose through oxidation. *Carbohydrate Polymers*, v. 87, p. 457-460, 2012.

TOSKAS, G.; HEINEMANN, S.; HEINEMANN, C.; CHERIF, C.; HUND, R-D.; ROUSSIS, V.; HANKE, T. Ulvan and ulvan/chitosan polyelectrolyte nanofibrous membranes as a potential substrate material for the cultivation of osteoblasts. *Carbohydrate Polymers*, v. 89, p. 997-1002, 2012.

USOV, A. I. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. *Food Hydrocolloids*, Oxford, v. 12, p. 301-308, 1998.

USOV, A. I.; ELASHVILI, M. Polysaccharides from Algae. 51.1 Partial reductive hydrolysis of sulfated galactan from red alga *Laurencia coronopus* J. Ag. (Rhodophyta, Rhodomelaceae) *Russ. J. Bioorg. Chem.*, v. 23, p.502-511, 1997.

USOV, A. I.; ELASHVILI, M., Investigation of sulfated galactan from *Laurencia nipponica* (Rhodophyta, Rhodomelaceae), using partial reductive hydrolysis. *Bot. Mar.*, v. 34, p. 553-560, 1991.

USOV, A. I.; Polysaccharides of the Red Algae. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, v. 65, p. 115-217, 2011.

USOV, A. I.; SHASHKOV, A. S. Polysaccharides of algae. 34. Detection of *iota*-carrageenan in *Phyllophora brodiaei* (Turn.) J. Ag. (Rhodophyta) using ¹³C-NMR spectroscopy. *Botanica Marina*, v. 28, p. 367-373, 1985.

USOV, A.I. NMR spectroscopy of red seaweed polysaccharides: agars, carrageenans and xylans. *Botanica Marina*, Berlin, v. 27, p. 189-202, 1984.

USOV, A.I.; KLOCHKOVA, N.G. Polysaccharides of algae. 45. Polysaccharide composition of red seaweeds from Kamachatka coastal waters (Northwestern Pacific) studied by reductive hydrolysis of biomass. *Botanica Marina*, Berlin, v. 35, p. 371-378, 1992.

VAN DE VELDE, F.; KNUTSEN, S. H.; USOV, A. I.; ROLLEMA, H. S.; CEREZO, A. S. ¹H and ¹³C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. *Trends in Food Science and Technology*, Amsterdam v.13, p.73-92, 2002.

VEEN, J.J. van; MACLEAN, R. M.; HAMPTON, K. K.; LAIDLAW, S.; KITCHEN, S.; TOTH, P.; MAKRIS, M. Protamine reversal of low molecular weight heparin: clinically effective? *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, v. 22, p. 565-570, 2011.

VLIEGHE, P.; CLERC, T.; PANNECOUQUE, C.; WITVROUW, M.; DE-CLERCQ, E.; SALLES, J. P.; KAROUS, J. L. Synthesis of new covalently bound *kappa*-carrageenan-AZT conjugates with improved anti HIV activities. *J. Med. Chem.*, v. 45, p. 1275-1283, 2002.

VOLD, I. M. N.; CHRISTENSEN, B. E. Periodate oxidation of chitosans with different chemical compositions. *Carbohydrate Research*, v. 340, p. 679-684, 2005.

WAHLUND, K-G. Field-flow fractionation for molar mass characterization of polysaccharides (chapter 17), *Field flow fractionation (Part IV)*. In: *Carbohydrate Analysis by Modern Chromatography and Electrophoresis*, Journal of chromatography library, v. 66, Ziad El-Rassi (ed.), 1256 p., Elsevier, 2002.

WANG, L.; WANG, X.; WU, H.; LIU, R. Overview on Biological Activities and Molecular Characteristics of Sulfated Polysaccharides from Marine Green Algae in Recent Years. *Marine Drugs*, v. 12, p. 4984-5020, 2014.

WELLS, M. L.; POTIN, P.; CRAIGIE, J. S.; RAVEN, J. A.; MERCHANT, S. S.; HELLIWELL, K. E.; SMITH, A. G.; CAMIRE, M. E.; BRAWLEY, S. H. Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *Journal of Applied Phycology*, v. 29, p. 949-982, 2017.

WHISTLER, R. L.; SPENCER, W. W. Sulfation. *Methods Carbohydrate Chemistry*, v. 4, p. 297-298, 1964.

WIJESEKARAA, I.; PANGESTUTIA, R.; KIMA, S. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate Polymers*, v. 84, p. 14-21, 2011.

WOOD, C. G. Seaweed extracts: a unique ocean resource. *Journal of Chemical Education*, v. 51, p. 449-452, 1974.

WU, X.; YE, Y.; CHEN, Y.; DING, B.; CUI, J.; JIANG, B. Selective oxidation and determination of the substitution pattern of hydroxypropyl guar gum. *Carbohydrate Polymers*, v. 80, p. 1178-1182, 2010.

YAICH, A. I.; EDLUND, U.; ALBERTSSON, A-C. Enhanced formability and mechanical performance of woodhydrolysate films through reductive amination chain extension. *Carbohydrate Polymers*, v. 117, p. 346-354, 2015.

YALPANI, M. A survey of recent advances in selective chemical and enzymic polysaccharide modifications. *Tetrahedron Report Number 188*. *Tetrahedron*, v. 41, p. 2957-3020, 1985.

YALPANI, M. Selective Chemical Modification of Polysaccharides. 231 p. Thesis (PhD in The Faculty of Graduate Studies) – Departament of Chemistry, The University of British Columbia, Vancouver, Canada, 1980.

YANG, X.; DU, H.; LIU, J.; ZHAI, G. Advanced Nanocarriers Based on Heparin and Its Derivatives for Cancer Management. *Biomacromolecules*, v. 16, p. 423-436, 2015.

YERMAK, I. M.; BARABANOVA, A. O.; AMININ, D. L.; DAVYDOVA, V. N.; SOKOLOVA, E. V.; SOLOV'EVA, T. F.; KIM, Y. H.; SHIN, K. S. Effects of structural peculiarities of carrageenans on their immunomodulatory and anticoagulant activities. *Carbohydrate Polymers*, v. 87, 713-720, 2012.

YOUNG, K. S.; BHATTACHARJEE, S. S.; YAPHE, W. Enzymic cleavage of the α -linkages in agarose, to yield agaro-oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, v.66, p. 207-212, 1978.

YU, G.; GUAN, H.; IOANOVICIU, A. S.; SIKKANDER, S. A.; THANAWIROON, C.; TOBACMAN, J. K.; TOIDA, T.; LINHARDT, R. J. Structural studies on κ -carrageenan derived oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, v. 337, p. 433-440, 2002.

YUAN, H.; SONG, J.; LI, X.; LI, N.; DAI, J. Immunomodulation and antitumor activity of κ -carrageenan oligosaccharides. *Cancer Letters*, v. 243, p. 228-234, 2006.

YUAN, H.; ZHANG, W.; LI, X.; LÜ, X.; LI, N.; GAO, X.; SONG, J. Preparation and in vitro antioxidant activity of κ -carrageenan oligosaccharides and their oversulfated, acetylated and phosphorylated derivatives. *Carbohydrate Research*, v. 340, p. 685-692, 2005.

YUAN, H.; SONG, J.; LI, X.; LI, N.; LIU, S. Enhanced immunostimulatory and antitumor activity of different derivatives of κ -carrageenan oligosaccharides from *Kappaphycus striatum*. *Journal of Applied Phycology*, v. 23, p. 59-65, 2011.

ZHOU, G.; SHENG, W.; YAO, H.; WANG, C. Effect of low molecular lambda-carrageenan from *Chondrus ocellatus* on antitumor H-22 activity of 5-Fu. *Pharmacological Research*, v. 53, n. 2, p.129-134, 2006.

ZIBETTI, R. G. M.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; COLODI, F. G.; DUCATTI, D. R. B.; FERREIRA, L. G.; CARDOSO, M. A.; CEREZO, A. S. Galactans from *Cryptonemia* species. Part II: studies on the system of galactans of *Cryptonemia seminervis* (Halymeniales) and on the structure of major fractions. *Carbohydrate Research*, Amsterdam, v. 344, p. 2364-2374, 2009.

ZIBETTI, R.G.M.; NOSEDA, M.D.; CEREZO, A.S.; DUARTE, M.E.R. The system of galactans from *Cryptonemia crenulata* (Halymeniaceae, Halymeniales) and structure of two major fractions. Kinetic studies on the alkaline cyclization of the unusual diad G2S \rightarrow D(L)6S. *Carbohydrate Research*, Amsterdam, v. 340, p. 711-722, 2005.

ZIERIS, A.; PROKOPH, S.; LEVENTAL, K. R.; WELZEL, P. B.; GRIMMER, M.; FREUDENBERG, U.; WERNER, C. FGF-2 and VEGF functionalization of starPEG-heparin hydrogels to modulate biomolecular and physical cues of angiogenesis. *Biomaterials*, v. 31, p. 7985-7994, 2010.